

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME ÉXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR  
LING TIAN

ÉTUDE DE L'ÉVALUATION DU POUVOIR INSECTICIDE DE DIVERSES  
SOUCHES DE Bacillus thuringiensis ENVERS LE DORYPHORE  
PAR BIOESSAIS EN CULTURES DE CELLULES DE DORYPHORE

AVRIL 1995

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## RÉSUMÉ

Le doryphore de la pomme de terre, Leptinotarsa decemlineata (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), est considéré comme un insecte nuisible important pour les plants de pomme de terre. Il est un ravageur causant la défoliation du plant surtout en entraînant des pertes de rendement très importantes en tubercules dans la culture de pomme de terre. Il peut aussi effectuer son cycle de développement sur la morelle douce-amère, les tomates et les aubergines. Ses apparitions sont plus évidentes dans certaines régions de plantation en grandes surfaces et sans rotation des cultures, il en résulte des pertes économiques très importantes. En Europe et au Québec, il y a beaucoup d'études qui sont menées sur le doryphore de la pomme de terre. Pour ce travail, nos objectifs étaient: 1) élaborer et caractériser une ou plusieurs lignées cellulaires de doryphore pouvant servir de substitut à l'insecte pour mesurer la toxicité d'insecticides biologiques et de pathogènes à l'aide de bioessais, 2) remplacer des tests normalement effectués sur l'insecte "in vivo" par des épreuves "in vitro" sur culture cellulaire du doryphore.

Les oeufs, larves et adultes de doryphore ont été récoltés directement en champs de pommes de terre dans la région de Trois-Rivières et ramenés au laboratoire pour la culture de cellules de doryphore et le démarrage d'un élevage en laboratoire. À la température de 22 à 24 °C, avec 60 à 70% d'humidité et une photopériode de 16:8 heures (jour:nuit), nous

avons réussi l'élevage des quatre formes du doryphore. De l'automne 1992 à avril 1994, nous avons obtenu 10 générations d'adultes du doryphore. Cela nous a fourni beaucoup de doryphores pour nos tests, notamment en hiver. Le travail sur les lignées de doryphore comporte les trois étapes suivantes; 1) obtention des lignées, 2) caractérisation des lignées, 3) mesure de la cytotoxicité des toxines du B.t..

1). Le choix des meilleurs milieux de culture cellulaire a été effectué sur 15 préparations de différents milieux. Nous avons trouvé les bons pH des milieux soit 7,0 pour la lignée DA1, 6,8 pour les lignées DA2, DL1 et DO1. On a décidé de préparer des milieux avec 5%, 10% et 20% de sérum de veau foetal. 1% d'un mélange de lipides a été ajouté dans le milieu contenant 20% de sérum de veau foetal. Pour la culture de cellules à partir de l'hémolymphe d'adultes du doryphore, on a obtenu une croissance de cellules plus rapide dans ce milieu que dans le milieu sans lipide. Aussi, nous avons résolu principalement deux problèmes pour la culture de cellules de doryphore soit la phénomène de mélanisation et la contamination qui nous ont donné beaucoup de difficulté au début de nos travaux. Enfin, nous avons trouvé les meilleurs milieux de culture cellulaire soit le milieu EX-CELL 400 et le milieu M3 pour les cultures de cellules du doryphore de la pomme de terre et, nous avons réussi à obtenir quatre lignées cellulaires de doryphore soit DA1, DA2, DL1 et DO1.

2). Au sujet de la caractérisation de la morphologie cellulaire en microscopie optique

et en microscopie électronique, nous avons trouvé les types de cellules dans les quatre lignées du doryphore soit de nature épithéliale, hémocyte, nerveuse et fibroblastique en microscopie optique. En microscopie électronique, la lignée DA1, présente de nombreuses vacuoles, mitochondries et globules de lipides vraisemblablement; aussi plusieurs cellules présentent de nombreuses digitations, le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Le caryotype des cellules du doryphore présente des types haploïde, diploïde, triploïde et tétraploïde chez les quatre lignées. Le temps de doublement de trois lignées (DA1, DA2 et DL1) du doryphore a montré que la lignée DL1 se multiplie le plus vite et la lignée DA1 le plus lentement.

3). Nous avons pu trouver des protéines toxiques du B.t. dans le surnageant de solubilisation des toxines du B.t. commercial. Ce que nous a démontré le dosage des protéines à l'aide de la technique Bio-Rad.

Les résultats du test de cytotoxicité sur les lignées DA1 et DL1 obtenus par les méthodes de cytotoxicité classique et d'évaluation de la cytotoxicité par marquage des cellules viables au BrdU; il nous montrent que le "Blank®" est de 2,2 à 17 fois moins toxique que les souches testées et constitue notre témoin. Les diverses souches de B.t. commerciaux sont toxiques pour les trois lignées cellulaires de doryphore et sont respectivement le Teknar H.P.D®, le M-one® et le Trident®, le MYX1806® et le Thuricide®. C'est parce que le Teknar H.P.D®. contient de la toxine CytA qui agit même

sur les cellules de mammifères, seulement présente dans cette souche, qu'il est le plus actif sur nos lignées. Le M-one® et le Trident® sont les deux B.t. qui fonctionnent le mieux car ils sont spécifiques au doryphore. Le MYX1806® et le Thuricide® sont moins toxiques que les autres souches de B.t. car les toxines de MYX1806® sont produites par la bactérie Pseudomonas (manipulée génétiquement) qui est par la suite fixée donc encapsulée. La toxine y est difficilement solubilisable. Les toxines de Thuricide® proviennent d'une souche spécifique normalement pour lépidoptère ce qui explique qu'elle est moins toxique pour les cellules de doryphore. Le test de la comparaison de la toxicité avec trypsine et sans trypsine, nous montre des résultats qui indiquent aucune différence entre les DTCT50 sans et avec traitement par la trypsine sauf pour le Thuricide®. Donc, les expériences de cytotoxicité démontrent que les deux méthodes peuvent être utilisées pour évaluer la cytotoxicité "in vitro" à l'aide de cellules qui peuvent être considérées comme un substitut de l'insecte.

## REMERCIEMENTS

Je veux tout d'abord remercier très sincèrement le Docteur Guy Charpentier, directeur du projet, ainsi que le Docteur Serge Belloncik, co-directeur, pour la confiance qu'ils m'ont accordée et l'intérêt soutenu qu'ils ont porté à cette étude, pour les critiques et corrections pertinentes lors de l'étude effectuée et de la rédaction du mémoire ainsi que pour leur aide financière.

Je tiens à remercier le Docteur Jean-Pierre Brouassa et le Docteur Jacques Boisvert pour la documentation et les conseils sur l'élevage de doryphore en laboratoire, le Docteur Hélène-Marie Thérien, le Docteur Raynald Gareau et le Docteur Éliane Shahum pour leur aide précieuse concernant la technique ELISA et leurs prêts de matériel.

Mes remerciement les plus francs vont à mademoiselle Marie-Laure Escudero et monsieur Christian Brousseau, pour les corrections du mémoire et surtout mademoiselle Christiane Sarrazin pour l'aide au début lorsque que j'ai commencé mon travail au laboratoire. Également, monsieur Fradette (Réseau de dépistage agricole du centre du Québec), mademoiselle Maryse Béland et mademoiselle Louise Lambert, pour leur aide en ce qui concerne la collecte de doryphore et l'élevage de doryphore en laboratoire.

Je suis très reconnaissante envers madame Monique Couillard (Institut Armand-Frappier), madame Micheline Boulianne, madame Diane Bégin et monsieur Jean-Louis Benoit (UQTR), pour leur disponibilité et le matériel fourni.

Finalement, je remercie également le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries, et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) qui a financé ce projet.

Aussi, je veux remercier spécialement mes parents, mon frère, mon mari et ma fille qui m'ont supporté lorsque j'ai étudié et travaillé en Maîtrise et lors de l'achèvement de mon mémoire.



## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ . . . . .	i
REMERCIEMENTS . . . . .	v
TABLE DES MATIÈRES . . . . .	vii
LISTE DES TABLEAUX . . . . .	xiv
LISTE DES FIGURES . . . . .	xvi
LISTE DES ANNEXES . . . . .	xviii
CHAPITRE I. INTRODUCTION . . . . .	1
1.1. LE DORYPHORE DE LA POMME DE TERRE . . . . .	1
1.1.1. LA PROBLÉMATIQUE DU DORYPHORE . . . . .	1
1.1.2. L'HISTORIQUE DES INFESTATIONS À DORYPHORE . . . . .	5
1.2. LE CONTRÔLE DU DORYPHORE . . . . .	7
1.2.1. LES MÉTHODES CULTURALES . . . . .	7
1.2.2. LES RÉSISTANCES DES PLANTES AUX INSECTES . . . . .	8
1.2.3. LES MOYENS PHYSIQUES . . . . .	10
1.2.4. LES MOYENS CHIMIQUES . . . . .	11

1.2.5. LES MOYENS BIOLOGIQUES . . . . .	14
1.3. LES BIOINSECTICIDES À BASE DE BACTÉRIES ( <u>Bacillus</u> <u>thuringiensis</u> ) . . . . .	17
1.3.1. LES CRISTAUX CRYIIIC DU <u>BACILLUS</u> <u>THURINGIENSIS</u> . . . . .	19
1.4. L'OBJECTIF DES TRAVAUX . . . . .	21
1.4.1. L'ÉTABLISSEMENT DE LIGNÉES CELLULAIRES DE DORYPHORE . . . . .	22
1.4.2. L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DE DIVERSES SOUCHES DU <u>B.T.</u> À L'AIDE DE TESTS DE CYTOTOXICITÉ EN CULTURE CELLULAIRES . . . . .	25
CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES . . . . .	27
2.1. COLLECTE DE DORYPHORES . . . . .	27
2.2. L'ÉLEVAGE DU DORYPHORE . . . . .	29
2.3. LA CULTURE CELLULAIRE DE DORYPHORE . . . . .	32
2.3.1. LE CHOIX DES MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE .	33
2.3.2. PRIMO-CULTURE . . . . .	35
2.3.3. SOUS-CULTURE . . . . .	38

2.4. LA CARACTÉRISATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE	
PERMANENTE OBTENUE . . . . .	39
2.4.1. MORPHOLOGIE CELLULAIRE EN MICROSCOPIE	
OPTIQUE . . . . .	39
2.4.2. MORPHOLOGIE CELLULAIRE EN MICROSCOPIE	
ÉLECTRONIQUE . . . . .	40
2.4.3. ANALYSE DU CARYOTYPE . . . . .	41
2.4.4. TEMPS DE DOUBLEMENT . . . . .	42
2.5. DOSAGE DE L'EFFET CYTOLYTIQUE DE TOXINES DE SOUCHES	
DE <u>BACILLUS THURINGIENSIS</u> SUR LES CELLULES DE LA	
LIGNÉE PERMANENTE OBTENUE D'ADULTES ET DE LARVES	
DE DORYPHORE . . . . .	43
2.5.1. LA SOLUBILISATION DES TOXINES . . . . .	45
2.5.2. LE DOSAGE DES PROTÉINES DES SURNAGEANTS DE	
SOLUBILISATION . . . . .	45
2.5.3. LE TEST DE CYTOTOXICITÉ EN CULTURE DE CELLULES	
DE DORYPHORE . . . . .	46
2.5.3.1. LA MÉTHODE D'ESSAI CYTOTOXIQUE	
CLASSIQUE . . . . .	46
2.5.3.2. LA MÉTHODE D'ÉVALUATION DE LA	
CYTOTOXICITÉ PAR MESURE DE LA VIABILITÉ	

CELLULAIRES PAR MARQUAGE ET DÉTECTION DU 5-Bromo-2'-Deoxy-Uridine (BrdU) . . . . .	47
2.5.4. LA COMPARAISON DE LA CYTOTOXICITÉ DE TOXINES DE DIVERSES SOUCHES DU <u>B.T.</u> SUR LES CELLULES DE DA1 AVEC TRAITEMENT À LA TRYPSINE ET SANS TRAITEMENT . . . . .	50
CHAPITRE III. RÉSULTATS ET ANALYSES . . . . .	51
3.1. COLLECTE ET ÉLEVAGE DE DORYPHORE . . . . .	51
3.1.1. LE COLLECTE D'INSECTES SUR LE TERRAIN . . . . .	51
3.1.2. LA CONSERVATION EN LABORATOIRE DES INSECTES RÉCOLTÉS . . . . .	51
3.1.3. LE DÉMARRAGE D'UN ÉLEVAGE EN LABORATOIRE .	53
3.2. ÉTABLISSEMENT DES LIGNÉES DE CELLULES DE DORYPHORE . . . . .	54
3.2.1. CHOIX DU MEILLEUR MILIEU . . . . .	54
3.2.2. OBTENTION DES LIGNÉES CELLULAIRES PERMANENTES . . . . .	56

3.3. RÉSULTATS DE LA CARACTÉRISATION DES LIGNÉES	
CELLULAIRE S PERMANENTES OBTENUES . . . . .	60
3.3.1. OBSERVATION DE LA MORPHOLOGIE DES LIGNÉES	
CELLULAIRES . . . . .	60
3.3.1.1. EN MICROSCOPIE OPTIQUE . . . . .	60
3.3.1.2. EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE . . . . .	65
3.3.2. DÉTERMINATION DU CARYOTYPE . . . . .	68
3.3.3. MESURE DU TEMPS DE DOUBLEMENT . . . . .	74
3.4. MISE AU POINT DE TEST DE CYTOTOXICITÉ EN CULTURE	
DE CELLULES DE MOUSTIQUE À L'AIDE DE MÉTHODE	
CYTOTOXIQUE CLASSIQUE . . . . .	76
3.4.1. DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES DES SURNAGEANTS	
DE SOLUBILISATIONS . . . . .	76
3.4.2. ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ EN CULTURE	
CELLULAIRE DE MOUSTIQUE . . . . .	78
3.5. RÉSULTAT DU DOSAGE DE L'EFFET CYTOLYTIQUE DE TOXINES	
DE SOUCHES DE <u>BACILLUS THURINGIENSIS</u> SUR LES CELLULE	
DES LIGNÉES PERMANENTES OBTENUES DE DORYPHORE . .	82
3.5.1. L'OBTENTION DE LA PROTÉINE TOXIQUE . . . . .	82
3.5.2. LE POTENTIEL DE CYTOTOXICITÉ SUR LES CELLULES	
DES LIGNÉES PERMANENTES OBTENUES . . . . .	84

3.5.2.1. RÉSULTATS DE LA MÉTHODE CYTOTOXIQUE CLASSIQUE . . . . .	84
3.5.2.2. RÉSULTATS DE LA MÉTHODE D'ESSAI PAR MARQUAGE AU BrdU DES CELLULES VIABLES . . . . .	90
3.5.3. LA COMPARAISON DE LA CYTOTOXICITÉ DE TOXINES DE DIVERSES SOUCHES DU <u>B.T.</u> SUR LES CELLULES DE DA1 AVEC TRAITEMENT À LA TRYPSINE ET SANS TRAITEMENT . . . . .	91
CHAPITRE IV. DISCUSION ET CONCLUSION . . . . .	94
4.1. L'ÉTABLISSEMENT D'UN ÉLEVAGE DE DORYPHORE . . . . .	94
4.2. L'OBTENTION DES QUATRE LIGNÉES CELLULAIRES DE DORYPHORE . . . . .	94
4.3. LA CARACTÉRISATION DES LIGNÉES CELLULAIRES PERMANENTES OBTENUES . . . . .	98
4.4. COMPARAISON DES ACTIVITÉS TOXIQUES DE DIVERSES SOUCHES DU <u>B.T.</u> . . . . .	100

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES . . . . .	106
---------------------------------------	-----

## LISTE DES TABLEAUX

1. Milieux des cultures de cellules utilisés pour l'obtention de primo-cultures . . . .	34
2. Diverses souches <u>Bacillus thuringiensis</u> et <u>Blank</u> utilisés . . . . .	44
3. Lignées de cellules de doryphore obtenues . . . . .	57
4. L'observation de la morphologie de lignées cellulaires en microscopie optique . .	61
5. Temps de doublement de chaque lignée obtenue . . . . .	75
6. Résultats de la cytotoxicité des <u>B.t.i.</u> et du Blank testés sur quatre lignées cellulaires de moustique . . . . .	77
7. Résultats de la cytotoxicité des <u>B.t.</u> et du Blank testés sur la lignée cellulaire d'adultes de doryphore (DA1) . . . . .	85
8. Résultats de la cytotoxicité des <u>B.t.</u> et du Blank testés sur la lignée cellulaire de larves de doryphore (DL1) . . . . .	86
9. Résultats de la cytotoxicité des <u>B.t.</u> et du Blank testés sur la lignée cellulaire d'œufs de doryphore . . . . .	87
10. Résultats du test de viabilité cellulaire avec le BrdU pour évaluer l'effet cytotoxique des <u>B.t.</u> et du Blank sur la lignée cellulaire d'adultes de doryphore (DA1) . . . . .	88
11. Résultats du test de viabilité cellulaire avec le BrdU pour évaluer l'effet cytotoxique des <u>B.t.</u> et du Blank sur la lignée cellulaires de larves de doryphore (DL1) . . .	89
12. La comparaison de cytotoxicité de toxines de diverses souches du <u>B.t.</u> sur les cellules	



DA1 avec traitement à la trypsine et sans traitement . . . . .	93
--	----

## LISTE DES FIGURES

1. Le cycle vital du doryphore . . . . .	3
2. Photographie de plants de pomme de terre détruits par les doryphores . . . . .	4
3. Photographie d'une collecte de doryphores dans un champ cultivé de pommes de terre de la région de Trois-Rivières . . . . .	28
4. Photographie illustrant l'élevage d'adultes et de larves de doryphore en laboratoire . . . . .	30
5. Photographie illustrant l'élevage à partir d'œufs de doryphore en laboratoire . . .	31
6. Photographie illustrant la conservation du doryphore au réfrigérateur . . . . .	52
7. Photographie illustrant les types cellulaires de quatre lignées des cellules obtenues en microscopie optique . . . . .	62
8. Photographie (900 x) illustrant la morphologie des cellules de la lignée DA1 en microscopie électronique . . . . .	66
9. Photographie illustrant la coloration des chromosomes des cellules de doryphore arrêtées en métaphase . . . . .	69
10. Le pourcentage des cellules présentant n, 2n, 3n et 4n chromonsomes de la lignée DA1 du doryphore . . . . .	70
11. Le pourcentage des celles présentant n, 2n, 3n et 4n chromosomes de la lignée DA2 du doryphore . . . . .	71

12. Le pourcentage des cellules présentant n, 2n, 3n et 4n chromosomes de la lignée DL1 du doryphore . . . . .	72
13. Le pourcentage des cellules présentant n, 2n, 3n et 4n chromosomes de la lignée DO1 du doryphore . . . . .	73
14. Photographies des lignées cellulaires d' <u>Aedes triseriatus</u> . . . . .	80

## ANNEXES

ANNEXE 1. La préparation du colorant à l'orcéine . . . . .	122
ANNEXE 2. La préparation du colorant au violet cristal . . . . .	123
ANNEXE 3. La méthode de dénombrement de cellules viables avec l'hématimètre	124
ANNEXE 4. Le calcul du temps de doublement . . . . .	126
ANNEXE 5. Le calcul du dosage de protéines de surnageant de solubilisation des toxines du <u>B.t.</u> . . . . .	128
ANNEXE 6. Le calcul de DTCT50 des diverses souches de <u>B.t.</u> et du blank . . .	130
ANNEXE 7. La préparation de la solution de P.B.S. utilisée . . . . .	132

## **CHAPITRE I**

## INTRODUCTION

### 1.1. LE DORYPHORE DE LA POMME DE TERRE

#### 1.1.1. LA PROBLÉMATIQUE DU DORYPHORE

Le doryphore de la pomme de terre, Leptinotarsa decemlineata (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), est considéré comme un insecte nuisible important pour les plants de pomme de terre. Le doryphore est un insecte phytophage principalement inféodé au plant de pomme de terre (Solanum tuberosum) mais il peut également effectuer son cycle de développement sur la morelle douce-amère, les tomates, les aubergines et le tabac ornemental (Bonnemaïson, 1962). Il est un ravageur causant la défoliation du plant surtout en entraînant des pertes de rendement très importantes en tubercules dans la culture de pomme de terre. Ses apparitions sont plus évidentes dans certaines régions de plantation en grandes surfaces et sans rotation des cultures. Évidemment, il en a résulté des pertes économiques très importantes. Beirne (1971) a rapporté que les pertes de rendement dues à ces attaques peuvent atteindre de 30 à 50%.

Coléoptère de la famille des Chrysomelidae, le doryphore est le principal ravageur de la culture de pomme de terre parmi les insectes nuisibles à cette culture: altise, cicadelle,

puceron et punaise terne (CPVQ, 1991). L'adulte du doryphore est brun jaunâtre, orné de 5 bandes longitudinales parallèles de couleur noire sur les élytres et de petites taches noires sur le pronotum. Dès leur sortie de terre au printemps, les adultes mangent le feuillage, s'accouplent et déposent des masses d'oeufs jaunes orangés sous les feuilles (voir figure 1.). La larve du doryphore est de coloration jaune à orangée et la tête noire brunâtre. Aussi, elle a une tâche brune sur le pronotum et une double rangée de taches noires sur les côtés de l'abdomen. À l'éclosion, les larves dévorent rapidement les feuilles. Il existe quatre stades larvaires. À maturité, les larves du quatrième stade s'enfoncent dans le sol, se transforment en nymphes et émergent sous forme adulte environ 10 à 15 jours plus tard. Il y a de deux à trois générations de doryphore par saison. En août et septembre, les adultes s'enfouissent dans le sol pour passer l'hiver à des profondeurs variables. A la fin de l'hiver, ils remontent peu à peu à la surface du sol. La sortie des doryphores débute après une période pluvieuse suivie d'une élévation de la température. Les insectes peuvent reprendre leur activité plusieurs jours avant l'apparition des feuilles des plants de pomme de terre. A ce moment là, les pertes de rendement de pomme de terre seront très grandes suite à l'attaque des jeunes plants. Lorsqu'il y a des dommages les plus graves, toutes les feuilles du plant de pomme de terre sont détruites par le doryphore entraînant une baisse de rendement (figure 2.) (Bonnemaison, 1962; CPVQ, 1991).

Avec les surfaces cultivées de pomme de terre qui graduellement augmentent, les problèmes des pertes de rendement seront plus grands. Il est donc nécessaire de contrôler

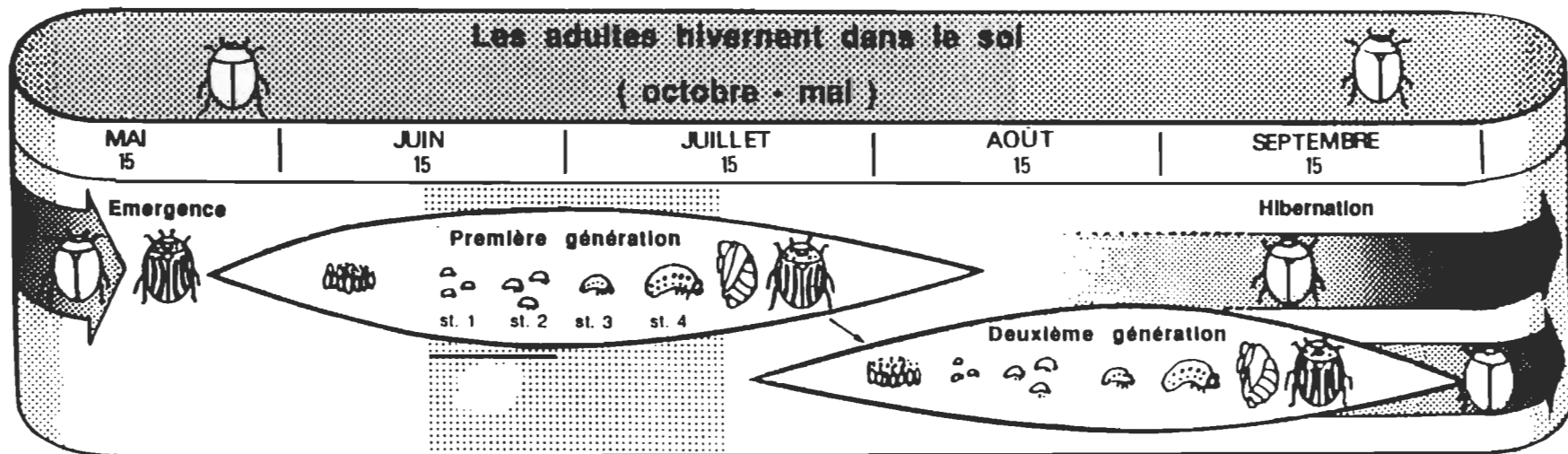


FIGURE 1. LE CYCLE VITAL DU DORYPHORE

Tiré de «Pomme de Terre» "Protection" (CPVQ)

AGDEX 161/605, Publication 02-9106, 1991.



**FIGURE 2**

**PHOTOGRAPHIE  
DE PLANTS DE POMME DE TERRE DÉTRUITS  
PAR LES DORYPHORES**



le doryphore.

### 1.1.2. L'HISTORIQUE DES INFESTATIONS À DORYPHORE

Le doryphore de la pomme de terre, est considéré comme le plus important défoliateur des plants de pomme de terre en Europe. Il est pourtant originaire du Mexique où ses plantes hôtes primaires sont Solanum angustifolium Mill. et Solanum rostratum Dunal (Walen, 1979). Dans ce pays, le doryphore est rarement trouvé sur le plant de pomme de terre cultivée. Le Solanum tuberosum L. est une culture introduite seulement vers 1940 au Mexique (Casagrande, 1987). Cette solanacée, cultivée à l'origine par les amérindiens des Andes, ne fut connue des Européens qu'après la découverte du Nouveau Monde. Les Espagnols l'ont introduite en Espagne au 16ième siècle (Hawkes, 1978). Depuis sa dispersion s'est effectuée. Vers 1600, elle était cultivée aux Indes, où elle fut introduite par les portugais (Horton, 1987). Aux États-Unis, en Virginie, elle a été introduite en 1621 (Harris, 1981). Graduellement, elle a été introduite vers l'ouest par l'action des colonisateurs. Ainsi, le contact entre le doryphore et cette nouvelle culture devenait possible (de Oliveira, 1993). Les premiers colons qui traversent les montagnes rocheuses transportèrent les graines épineuses des Solanacées sauvages qui s'accrochaient à leurs vêtements et qui furent disséminées le long des pistes. Cela permit au doryphore de se disperser et finalement d'atteindre les régions où la pomme de terre est cultivée (Bonnemaison, 1962), plus particulièrement dans le nord-est de l'Amérique.

Bien que ce ravageur ait été en présence de la pomme de terre cultivée avant 1820 (Casagrande, 1987), la première mention écrite faisant état des dommages causés dans cette culture ne datent que de 1859 et concerne le Nebraska (Walsh, 1865). A cette époque, la culture de la pomme de terre occupait de grandes surfaces tant au Nebraska que dans les états de l'est des États-Unis (Anonyme, 1864). Le doryphore, adapté à cette culture, a augmenté sa population et s'est répandu vers l'est. Il atteignait les côtes de l'océan Atlantique ainsi que le Québec et l'Ontario en 1874 (Riley, 1876). La dispersion de ce phytophage à travers les États-Unis et le Canada a été bien décrite par Tower (1906), Riley (1876) et Walsh (1865, 1866)(de Oliveira, 1993).

En Europe, le doryphore fut signalé pour la première fois en Allemagne à Mülheim en 1877. Deux autres foyers furent relevés en 1887 et 1914. Aussi, il a été observé en 1901 en Angleterre, et en 1922 en France aux environs de Bordeaux (Bonnemaison, 1962).

Depuis, le doryphore a été reconnu comme un insecte nuisible pour la pomme de terre (Edgerton 1861, Walsh 1865) et il a eu des impacts importants sur cette culture ainsi que sur les producteurs.

En raison de ces pertes de rendement de la pomme de terre causées par le doryphore, on a utilisé et recherché des moyens physiques, chimiques, biologiques et cultureux de contrôle.

## 1.2. LE CONTRÔLE DU DORYPHORE

### 1.2.1. LES MÉTHODES CULTURALES

Les méthodes culturales, moyens physiques qui regroupent de nombreuses stratégies, peuvent être utilisées afin de diminuer la défoliation par le doryphore, et elles peuvent plus ou moins réduire les populations de doryphores.

À cause du comportement du doryphore lors de sa sortie et son déplacement au printemps, on a intérêt dans les régions où le printemps est doux à planter des variétés de pommes de terre précoces dont le feuillage sera bien développé au moment de la sortie des doryphores (Bonnemaïson, 1962).

Aussi, on a adopté des méthodes de rotation des cultures et des cultures mixtes. L'importance de la rotation des cultures a été démontrée par des travaux de recherche sur le retardement ou la réduction de la croissance des populations de doryphore lors du passage des barrières physiques et environnementales d'un champ à l'autre (Hamel, 1990). Le buttage à la levée des plants retarde aussi leur cycle vital (Hamel, 1991). Les cultures mélangés avec la culture de maïs, de blé, ... etc, peuvent aussi avoir un potentiel pour réduire ou supprimer les populations de doryphores en masquant les odeurs attractives des plants de pomme de terre (de Oliveira, 1992).

D'ailleurs, les conditions naturelles sont très importantes pour le développement de population du doryphore. Un climat humide ne convient pas au développement du doryphore et les attaques sont moins graves dans les contrées humides ou à climat maritime que celles à climats continentaux ou semi-continentaux (Bonnemaison, 1962). C'est pourquoi notamment la culture de la pomme de terre est tellement développée dans les provinces maritimes au Canada. La mortalité est très importante lorsque les larves de la première génération pénètrent dans le sol pour se nymphoser; si le sol est desséché en surface, les larves n'ont pas la capacité de perforer la croûte superficille (Bonnemaison, 1962). Il faut éviter à ce moment là les arrosages trop abondants.

#### 1.2.2. LES RÉSISTANCES DES PLANTES AUX INSECTES

La résistance des plantes est la capacité qui est due à la composition de la feuille qui déplaît ou est toxique à l'insecte, ou au port de la plante ou à la disposition des feuilles ou des tiges de la plante, pour différentes variétés de plantes. Elle est due aussi au fait que certaines d'entre elles sont capables après avoir été fortement attaquées de produire rapidement de nouvelles feuilles après la défoliation et d'assurer un rendement satisfaisant en tubercules malgré la présence de ravageurs (Trouvelot et al., 1937; Trouvelot, 1939; Chin, 1950; Mckinley, 1988).

Quelques Solanum tubérifères sauvages (S. demissum, S. chacoense) peuvent

diminuer fortement la ponte du doryphore et occasionner la mort des larves (Trouvelot et Grison, 1935). Kuehn a isolé un alcaloïde toxique, la démissine, de S. demissum (Bonnemaison, 1962).

La résistance présente chez la pomme de terre contre les insectes ravageurs est cependant peu utilisée en pratique (Radcliffe, 1982).

On s'est efforcé de créer des hybrides de la pomme de terre cultivée (Solanum tuberosum) et des solanacées sauvages, notamment de Solanum demissum. Cependant, ces recherches n'ont pas donné de résultats satisfaisant (Bonnemaison, 1962).

Récemment, la recherche de systèmes de transgénèse pour lutter contre le doryphore a eu lieu. Les gènes de toxines de Bacillus thuringiensis peuvent être introduits dans la plante pour lutter contre les insectes nuisibles (Adang et al., 1993; Barton et Miller, 1993). Le plant transgénétique pourrait, d'ici cinq ans, devenir un moyen de lutte très répandu. Par des procédés de la biotechnologie, on incorpore le gène d'une toxine de Bacillus thuringiensis dans le code génétique d'un plant de pomme de terre. Ce gène commande la production d'une toxine responsable de la mort des jeunes larves (Perlak et al., 1993).

### 1.2.3. LES MOYENS PHYSIQUES

Depuis quelques années, des producteurs de Californie luttent contre certains insectes au moyen d'aspirateurs mécaniques. Le RDACQ (Réseau de Dépistage Agricole du Centre du Québec) a fait l'essai en champ d'un aspirateur fabriqué au Wisconsin: le "Bug-buster". Ce bio-collecteur (aspirateur mécanique) est une invention allemande et est coûteux. Il peut être utilisé sur quatre ou six rangs à la fois et peut aspirer 90% des grosses larves et 50 à 70% des adultes. Cependant, l'aspirateur possède certains inconvénients tels que moins de compactage du sol, le bris des rangs et des plants, et il est utilisé sur quatre rangs à la fois seulement (Hamel, 1991). Il ne peut pas éliminer tous les insectes. Certaines espèces d'insectes, comme le puceron, collent aux plantes et ne sont pas aspirées (Sauriol, 1991).

Le brûleur au propane est un autre moyen mécanique de lutte qui a été à l'essai au Québec en 1991. Des producteurs utilisent des brûleurs au propane pour détruire les mauvaises herbes et défaner les plants en fin de saison. Cette technique a premièrement été utilisée pour lutter contre le doryphore à Long Island, New York. Le brûleur est passé sur le champ de pommes de terre. Le passage rapide brûle les pattes des doryphores qui tombent et meurent de faim. L'efficacité a été de 70 à 80% contre les adultes hivernants, alors qu'elle est de 25 à 50% pour les insecticides chimiques. On a observé aussi une mortalité des oeufs de 35% (Hamel, 1991). L'appareil sert par la même occasion au



défanage des plants à la fin de la saison.

#### 1.2.4. LES MOYENS CHIMIQUES

L'insecticide chimique représente encore le moyen de lutte le plus utilisé. Pendant plus de quatre vingt ans, le doryphore a été contrôlé avec plus ou moins de succès par des insecticides chimiques.

L'insecticide inorganique, cryolite (fluoaluminate de sodium) a été utilisé pour la première fois en 1929. Son action est de libérer des ions fluorures inhibant certains processus enzymatiques chez l'insecte. Pour le contrôle du doryphore, il fut considéré comme un insecticide stomacal. De plus, il a causé seulement une faible mortalité du prédateur Perillus bioculatus (Hough-Goldstein et Keil, 1991).

Les autres insecticides appliqués pour lutter contre le doryphore comprennent des organochlorés (DDT), des organophosphorés (azinphosmethyle), des carbamates (carbofuran) et des pyréthroïdes (perméthrine). Ce sont des pesticides chimiques bien connus en agriculture et ils exercent diverses actions sur le métabolisme des insectes (Heim et al., 1990; Tisler et Zehnder, 1990; Ioannidis et al., 1991).

Au fur et à mesure que les industries d'insecticides se sont développées et que les

insecticides synthétiques sont employés sur de grandes superficies, le résultat final a été l'apparition d'une résistance importante des insectes. Le doryphore qui, comme d'autres insectes, est doté d'un système de défense efficace et d'une résistance considérable aux insecticides chimiques. Le doryphore a acquis une résistance au DDT vers le milieu des années cinquante (Gauthier et al., 1981). Aux États-Unis, en Italie, en Russie, au Japon...etc, on a rapporté la résistance du doryphore (Ioannidis et al., 1991; Tisler et Zehnder, 1990; Heim et al., 1990; Roush et al., 1990) et la présence des résidus et des pollutions des insecticides chimiques dans l'environnement (Pucci, 1992).

Au Canada, la première mention d'une résistance de population de doryphores au DDT a été en Alberta en 1962 (McClanahan et Founk, 1981). Au Québec, les premières populations ayant montré une résistance au carbofuran ont été signalées en 1979 (Harris et Svec, 1981). En laboratoire, on a démontré que ces populations manifestaient aussi une résistance au DDT et à plusieurs autres insecticides (de Oliveira, 1992). Roush et al. (1990) ont indiqué que le doryphore a montré une résistance significative à tous les insecticides synthétiques modernes au moins dans le nord-est de l'Amérique.

Donc, les populations de doryphores ont développé divers niveaux de résistance pour toutes les classes d'insecticides (Hoffmaster, 1979; Gauthier et al., 1981; Forgash, 1985; Goh et al., 1988; Tisler et Zehnder, 1990). On cherche et détecte constamment de nouveaux niveaux de résistance aux insecticides dans différentes régions de l'aire de

distribution du doryphore (Heim et al., 1990; Tisler et al., 1990; Follett, 1993). L'apparition de résistances peut être retardée et mieux gérée par une étude des niveaux de résistance et la connaissance des résistances croisées possibles entre les diverses classes d'insecticides chez les insectes (French et al., 1992).

Une partie des recherches sur le terrain tiennent compte de l'utilisation d'insecticides et également de l'efficacité de chacun des insecticides. Par exemple, le Réseau de dépistage agricole du centre du Québec (RDACQ) a continué de déterminer la sensibilité ou la résistance du doryphore aux insecticides chimiques en 1991. Il est indiqué que les petites larves sont souvent plus sensibles aux insecticides chimiques que les grosses larves et les adultes. Les facteurs de température, pH, l'utilisation de buses adaptées... etc, peuvent affecter l'efficacité d'un insecticide (Hamel, 1991).

Lors de l'application des insecticides chimiques, il est inévitable de causer une contamination environnementale et il peut s'accumuler dans l'écosystème, dans la chaîne alimentaire et former des résidus dans l'environnement et les organismes non-cibles.

Finalement, plusieurs populations de doryphores ont montré des résistances et la présence des résidus d'organochlorés, d'organophosphorés, de carbamates et certaines pyréthroïdes a été notée dans l'environnement. De plus, cette résistance aux insecticides est probablement présente dans tout l'Est du Canada, là où l'on pratique la culture de la

pomme de terre.

L'extraction des composés du Neem (Kernel) qui proviennent des graines de l'arbre du Neem (Azadirachta indica) ont attirés récemment d'intérêt des entomologistes et des phytochimistes. Une expérience avec des doryphores adultes qui ont été traités par le NSKE aqueux et le AZT-VR-K, deux extraits des graines du Neem, a montré une réduction significativement importante de la fécondité du doryphore (Schmutterer, 1990). Aussi cet insecticide botanique peut causer une mortalité des larves significative (Hough-Goldstein et al., 1991). Il faudra surveiller le développement de cet insecticide dans l'avenir.

#### 1.2.5. LES MOYENS BIOLOGIQUES

À cause de la limitation des méthodes physiques et des méthodes chimiques, les recherches se sont orientées vers la lutte biologique. C'est une des stratégies les moins comprises et les moins étudiées aux États-Unis. Au Canada, ce n'est que récemment que des études ont vraiment débuté sur les méthodes de lutte biologique contre le doryphore.

En 1923, 1952 et 1961, on a rapporté la présence de prédateurs du doryphore comme Perillus bioculatus (Burgerjon et Biache, 1966) qui peut se nourrir des oeufs, des larves et des adultes de doryphore. Par exemple, un pathogène du doryphore (Knight 1923 et 1952) Nosema leptinotarsae sp.n. (protozoaire, microsporidie) peut infecter les cellules

de l'hémolymphe de 20% d'adultes de doryphore (Lipa, 1968).

Depuis plusieurs années, on est en train de détecter et rechercher des méthodes biologiques pour lutter contre les populations de doryphores.

Dans une partie des recherches pour la lutte biologique, on a voulu tenir compte des prédateurs du doryphore, comme des ennemis naturels. Par exemple, Coleomegilla maculata un coccinellidé est un prédateur causant une mortalité importante pour les oeufs du doryphore (Cappaert et al., 1991; Giroux et al., 1994). Cependant, au cours des traitements avec des insecticides chimiques en champ, le nombre d'ennemis naturels a diminué depuis quarante ans. Il y a parmi ceux-ci entre autres Harpalus sp., Agonum sp., Pterostichus sp., Carabus sp. et Lebia grandis qui sont tous des Carabidae (Coléoptère), ainsi que les coccinelles, Coleomegilla maculata et Hippodamia convergens, et des pantatomidae, Perillus bioculatus et Podisus maculiventris.

Le prédateur Perillus bioculatus se nourrit seulement de doryphores. Le P. bioculatus peut contrôler le doryphore lorsque la population de celui-ci est faible et il peut être efficace dans le champ (Biever et Chauvin, 1992). Malgré le fait que P. bioculatus présente un bon potentiel de lutte contre le doryphore, ce prédateur ne semble pas éviter des pertes significatives à la récolte de pomme de terre dans des conditions naturelles. On a tenté d'établir une série de contrôle avec le prédateur P. bioculatus dans plusieurs pays

dont les États-Unis (Tamaki et Butt, 1978). Le prédateur P. bioculatus y a été introduit, mais les efforts d'acclimatation de ce prédateur n'ont pas eu de succès (de Oliveira, 1993).

Podisus maculiventris est un polyphage reconnu comme un agent de lutte efficace dans certaines cultures comme celles de la luzerne et du pommier. Il est prédateur du doryphore à partir du deuxième stade jusqu'au cinquième stade. Les deuxième et troisième stades larvaires de P. maculiventris consomment environ 1.5 petite larve par jour, tandis que les quatrième et cinquième stades consomment une grosse larve par jour (de Oliveira, 1992).

Plusieurs espèces de parasitoïdes peuvent parasiter l'oeuf et la larve de doryphore. Le parasitoïde tachinidé, Myiopharus americanus, cause 80% de mortalité chez les larves aux États-Unis (Cappaert et al., 1991). Le parasitoïde tachinidé, Hyalomyodes triangulifera est largement distribué aux États-Unis (Cappaert et al., 1991). Le parasitoïde Doryphorophaga doryphorae parasite les larves du doryphore du deuxième au quatrième stade (Sears, 1987). Le parasitoïde Edovum puttleri, un Eulophidae, est un parasitoïde des oeufs de Coléoptères Chrysomelides (Pucci, 1992). Les tachinides sont des parasitoïdes d'adultes du doryphore (Cappaert et al., 1991). Ces études indiquent que les parasitoïdes sont aussi des prédateurs du doryphore et peuvent servir dans la lutte biologique.

En ce qui concerne les entomopathogènes, ce groupe comprend plusieurs organismes

isolés de populations naturelles de doryphores ou d'autres insectes et montre une pathogénicité variable. Il comprend des bactéries, des micro-champignons, des protozoaires, des virus et des nématodes.

Les microsporidies (Nosema leptinotarsae) sont considérés comme un protozoaire qui peut infecter l'hémolymphe et provoquer une atrophie du corps gras. Il a été utilisé dans le contrôle du doryphore où il a provoqué 20% de mortalité (Lipa, 1968).

Paecilomyces farinosus et Beauveria bassiana sont des champignons isolés du doryphore sur le terrain (Kamionek et al., 1974). Les champignons ont été employés pour lutter contre le doryphore, surtout les deux champignons Beauveria bassiana (Bals) et Paecilomyces farinosus (Dicks) qui sont les plus importants (Bagan et al., 1982), et Paecilomyces fumosus-roseus (Wize) et Metarhizium anisopliae (Metsch) sont aussi efficaces.

Dans la littérature, nous n'avons pas retrouvé de mention d'utilisation des virus et des nématodes pour la lutte contre le doryphore dans les champs de pomme de terre.

### 1.3. LES BIOINSECTICIDES À BASE DE BACTÉRIES (Bacillus thuringiensis)

À présent, beaucoup des recherches pour le contrôle biologique ont été orientées

vers les bactéries.

La plupart des bactéries qui sont des pathogènes des insectes, sont comprises dans les Pseudomonadaceae, les Enterobactériaceae, les Lactobacillaceae, les Micrococcaceae, et les Bacillaceae (Bulla et Yousten, 1979).

Bacillus popilliae est une bactérie pathogène de certains coléoptères scarabéidés (Dutky, 1940; Rhodes, 1965; St. Julian et Bulla, 1973). Il peut être ingéré par les insectes causant leur mort par multiplication dans l'haemocoèle. Le site de l'infection est dans l'hémolymphe qui contient les spores de B. popilliae et B. lentimorbus. Les conditions physiques et chimiques du sol, les conditions climatiques, les pratiques agricoles et horticoles, et la densité des populations de larves peuvent influencer l'efficacité de ces bactéries dans la nature (Bulla et Yousten, 1979). Ces insecticides microbiens peuvent persister et être considérés comme des insecticides presque permanents après un premier épandage.

Les recherches s'orientent surtout vers le Bacillus thuringiensis qui est une bactérie du sol de Gram-positif. Elle produit des inclusions cristallines protéiques lors de la sporulation. Les cristaux sont composés d'une protéine d'une toxicité élevée pour les insectes sensibles (Gill et al., 1992; Aronson, 1993).



Il y a plusieurs souches de Bacillus thuringiensis qui ont été rapportées être toxiques pour lépidoptères, diptères et coléoptères. Argauer et al. (1991) a indiqué que B.t. var. morrisoni a une exotoxine extracellulaire qui peut lutter contre les larves du doryphore.

Les autres sérotypes, le B. t. var. Berliner, et le B. t. var. thuringiensis contiennent aussi une delta-exotoxine et l'on peut obtenir un contrôle efficace du doryphore à partir d'elles (Cantwell et Cantelo, 1981, 1984; Cantwell et al., 1983).

Ainsi, après que le marché d'insecticides chimiques fut à la baisse, le B.t. a été introduit comme produit commercial. Plusieurs compagnies travaillent à la fabrication et la vente de l'insecticide biologique du B.t..

L'application du B.t. sur le terrain a beaucoup d'avantages: 1) la facilité d'application, 2) l'intégration possible avec des insecticides chimiques conventionnels dans un programme de traitement, 3) la facilité de stockage, 4) le coût qui est abordable, 5) ces insecticides bactériens se fabriquent facilement, 6) la virulence pour l'insecte cible est élevée et 7) la sécurité pour l'utilisateur et la faune et la flore non-cible (Bulla et al., 1979).

#### 1.3.1. LES CRISTAUX CRYIIIC DU BACILLUS THURINGIENSIS

Deux sérotypes de Bacillus thuringiensis qui produisent des cristaux ayant une delta

endotoxine de type cryIIIC semblent très efficaces contre le doryphore de la pomme de terre, soit Bacillus thuringiensis var. tenebrionis et Bacillus thuringiensis var. San Diego. Les souches EG2185, BTS137J, BT256-82 (Krieg et al., 1987), EG4961 (Johnson et al., 1993), NCIMB40152 (Cidaria et al., 1991), NOVOBTT (Schmidt et kirfman, 1992) et EG2838 et EG4961 (Rupar et al., 1991) de B. t. qui aussi proviennent de B.t. var. tenebrionis et var. San Diego ont été rapportées plus récemment, et sont aussi efficaces pour contrôler les populations de doryphores de la pomme de terre. Les recherches sur les deux premiers sérotypes de B. t. se sont développées plus rapidement et on en a fabriqué commercialement pour l'application dans les champs de pomme de terre.

Les formulations M-one (B.t. var. San Diego) de Mycogen Corporation, MYX-1806 (M-one plus) de Mycogen Corporation et Trident (B.t. var. tenébrionis) de Sandoz Agro Canada Inc. sont utilisées pour remplacer les insecticides chimiques et lutter contre le doryphore. Ells peuvent aussi être insérées dans un programme de lutte intégrée.

En 1989, des essais en champs ont été réalisés au Québec avec les B.t.(San Diego et tenébrionis). Les résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre le M-one et le Trident. Le moment d'application du B.t. est encore plus important que pour les insecticides chimiques, car le B.t. n'est vraiment efficace que pour les jeunes larves (stades 1 et 2). À court terme, le B.t. semble défavorisé, car il est dispendieux (15 à 20\$ l'acre). Il n'est pas polyvalent et n'est pas meilleur que les insecticides chimiques

actuellement utilisés. Mais cet insecticide pourrait éventuellement être un atout important pour limiter la résistance aux insecticides chimiques du doryphore et pour améliorer la qualité écologique de la pomme de terre (Hamel, 1990). En 1991, le RDACQ a essayé dans deux champs le MYX-1806 (M-one plus). Les résultats démontrent qu'il est beaucoup plus efficace que le M-one classique à cause de sa plus grande rémanence sur le feuillage (Hamel, 1991).

Duchesne (1990) a rapporté que depuis 1987 à Saint-Augustin (Québec), on a réalisé des épandages avec trois sérotypes du B.t. (tenebrionis, San Diego et 3a3b kurstaki) contre le doryphore. On a obtenu des résultats satisfaisants. Ces sérotypes sont principalement toxiques pour les jeunes larves (1 à 2 stades). Cependant la rémanence et la persistance sont faibles.

L'insecticide biologique, le B.t., pourra donc avoir un grand développement en ce qui concerne la lutte contre le doryphore.

#### 1.4. L'OBJECTIF DES TRAVAUX

L'objectif principal de ce projet est d'élaborer et caractériser une ou plusieurs lignées cellulaires de doryphore pouvant servir de substitut à l'insecte pour mesurer la toxicité d'insecticides biologiques et de pathogènes à l'aide de bioessais.

Les tests normalement effectués sur l'insecte "in vivo" seront remplacés par des épreuves "in vitro" sur cultures cellulaires du doryphore tel qu'appliquées par l'industrie dans le cas d'autres insectes. Ces cultures cellulaires auront aussi leur importance lors de la caractérisation de nouvelles souches de B. t. ou de virus.

#### 1.4.1. L'ÉTABLISSEMENT DE LIGNÉES CELLULAIRES DE DORYPHORE

Une première tentative de culture de cellules "in vitro" a été réalisée par Ross et Harrison en 1907 avec un petit morceau de tissu embryonnaire d'une grenouille (Butler, 1988). Goldschmidt en 1915 est le premier à tenter une culture cellulaire d'insecte "in vitro" (Grace, 1982).

En 1935 et 1938, Grace et Trager ont commencé à faire une série d'études concernant la multiplication de virus dans des cellules sans spécifiquement travailler sur la croissance des cellules elles-mêmes.

Trager a axé ses travaux sur la culture de fragments d'ovaires de vers-à-soie. Le milieu primaire est très simple; par exemple, des solutions de sels et des sucres qui sont considérées comme une source d'énergie sont additionnées dans le milieu.

Trager a fait d'abord l'étude des caractéristiques physiques et chimiques de

l'hémolymph du vers-à-soie, et il a obtenu un milieu à partir de ces données qui pouvait maintenir la croissance de cellules et qui pouvait assurer la multiplication de virus dans ces cellules (Grace, 1982).

Pour les cultures de cellules d'insecte, l'hémolymph est souvent utilisée comme supplément contenant des facteurs de croissance (de multiplication cellulaire). L'hémolymph a seulement besoin de traitement à la chaleur. On peut l'employer pour cultiver différents stades de l'insecte. Mais, l'extraction de l'hémolymph de l'insecte est l'étape la plus difficile. L'hémolymph est souvent remplacée par un substitut soit un sérum animal qui est habituellement du sérum de veau foétal de 5% à 20% dans le milieu pour diverses cellules d'insectes (Vaughn, 1973).

L'autre problème en culture de cellules outre la confection du milieu de culture est la contamination des cellules pendant la culture cellulaire par des microorganismes (surtout les bactéries, les champignons et les mycoplasmes). Ce problème a été résolu par l'apparition des antibiotiques (telles les penicillines et la streptomycine en 1940) et des antifongiques. Finalement, le choix du bon pH et de la pression osmotique du milieu compatible avec les cellules d'insectes que l'on veut cultiver sont importants (Grace, 1982; Wyatt et Wyatt, 1976).

Au fur et à mesure du développement de culture de cellules, beaucoup plus de

milieux ont été confectionnés. Par exemple: le milieu de Grace (1962) qui est utilisé largement pour les cellules de Lépidoptères; le milieu de Mitsuhashi et Maramorosch (1964, 1967) pour cultiver des cellules de moustiques (Diptères) ...etc.

Maintenant, les techniques de cultures de cellules et de tissus d'insectes sont établies depuis environ 30 ans, comme une approche de succès et de valeur, qui sera développée et améliorée pour servir à l'étude et à l'isolement des pathogènes d'insectes.

En ce qui concerne l'établissement de cultures de cellules de doryphore, il y a eu récemment, la description d'une lignée cellulaire établie à partir des tissus embryonnaires (oeufs) de doryphore (Dübendorfer et Liebig, 1992). Le but principal de ce travail a été une étude de l'embryologie et de l'endocrinologie du doryphore à l'aide des cellules embryonnaires et des cellules différenciées qui sont produites à partir de cellules embryonnaires avec ou sans addition d'ecdysone. Son deuxième but était d'étudier l'activité de toxines du Bacillus thuringiensis à l'aide des cellules embryonnaires de doryphore. Mais rien n'a encore été publié par ces auteurs à ce sujet.

Aucune culture de cellules de doryphore à partir de tissus de larves, de nymphes et d'adultes, n'a été rapporté jusqu'à ce jour dans la littérature.

#### 1.4.2. L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DE DIVERSES SOUCHES DU B. T. À L'AIDE DE TESTS DE CYTOTOXICITÉ EN CULTURE CELLULAIRES

La culture de cellules d'insectes a été employée pour l'isolation et l'identification de virus d'insectes ou transmis par les insectes et pour leur étude (Whitaker et Whitaker, 1972; Paul, 1970). On espère que des cellules d'animaux ou d'insectes cultivées qui sont utilisées pour les tests "in vitro" remplaceront les essais sur animaux (Butler, 1988).

McIntosh et al. (1985) se sont servis de 5 lignées cellulaires de lépidoptères pour multiplier et étudier des virus (A.c.MNPV, T.n.MNPV, G.m.MNPV) et ils ont obtenu de bons résultats. Avec les bactéries ou leurs toxines pathogènes d'insectes, on a aussi fait des bioessais basés sur la cytotoxicité au niveau de culture de cellules, surtout avec Bacillus thuringiensis depuis 20 ans, avec des résultats intéressants (Yoshida et al., 1993; McCarthy et al., 1988; Dai et Gill, 1993; Angsuthanasombat et al., 1991).

Par rapport aux toxines des diverses souches de Bacillus thuringiensis, on a utilisé les cultures de cellules d'insectes pour étudier leurs modes d'action tant au point de vue cytolytique, qu'ultrastructurale, que biochimique, pour isoler les récepteurs membranaires de ces toxines et comme outil pour leur dosage (Knowles et Ellar, 1987; Murphy et al., 1976; Knowles, 1989; Johnson, 1987).

La plupart des études ont été faites sur des cellules de moustique (Aedes aegypti) et les cellules de tordeuse des bourgeons de l'épinette (Choristoneura fumiferana), et ayant rapport avec les toxines de Bacillus thuringiensis var. israelensis et Bacillus thuringiensis var. kurstaki (Ingle et al., 1993; Nishiitsutsuji-Uwo et al., 1980; Johnson, 1983; Himeno et al., 1985).

Pour l'étude des cellules de doryphore avec les toxines de Bacillus thuringiensis var. tenebrionis, Bacillus thuringiensis var. San Diego jusqu'à présent, il n'y en a pas de rapporté. Nos objectifs: 1) mesurer les activités cytolytiques des divers toxines de plusieurs souches de B.t. sur cellules de doryphore; 2) et éventuellement étudier leur mode d'action.



## CHAPITRE II

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1. COLLECTE DE DORYPHORES

Dans le but d'effectuer nos travaux concernant l'établissement de lignées cellulaires permanentes de doryphore et l'évaluation de la toxicité pour celui-ci de diverses souches de Bacillus thuringiensis, il a été nécessaire d'effectuer des collectes de l'insecte en champ.

Au Québec, à la fin du mois de mai, quand la température est de plus en plus élevée, les doryphores adultes hivernants montent vers la surface du sol. Au début du mois de juin, les pommes de terre sont cultivées dans le champ. Les tiges des plants de pomme de terre ont grandi au-dessus du sol un peu plus tard et avec la température et l'humidité qui sont aussi des conditions importantes pour la sortie de doryphore, les adultes sortent progressivement du sol vers les plants de pomme de terre.

À cette période, on collectait soit les adultes de doryphore, ou dans les 15 à 20 jours suivants, on collectait des oeufs de doryphore, ou dans les 25 à 30 jours suivants, on pouvait collecter les larves de doryphore. En l'espace de 30 à 45 jours, le doryphore peut finir une génération de sa croissance. Si le climat est bon, il se multiplie plus vite dans le

**FIGURE 3**

**PHOTOGRAPHIE D'UNE COLLECTE DE DORYPHORES  
DANS UN CHAMP CULTIVÉ DE POMMES DE TERRE  
DE LA RÉGION DE TROIS-RIVIÈRES**



champ de pomme de terre. On peut récolter 2 à 3 générations de doryphore avec les trois stades; œuf, larve et adulte, du mois de juin à septembre. Ainsi, nous avons pu obtenir beaucoup d'échantillons de doryphore pour notre travail.

Toutes les collectes sont effectuées dans des champs où sont cultivées des pommes de terre dans la région de Trois-Rivières (Figure 3).

Certaines proviennent des collectes de Monsieur Fradette (Réseau de dépistage agricole du centre du Québec), mais aussi directement de champs de pommes de terre dans la région de Trois-Rivières par Melle. Maryse Béland.

## 2.2. L'ÉLEVAGE DU DORYPHORE

Ayant besoin de beaucoup de doryphores pour les essais de mise en culture de cellules même en hiver, on a collecté beaucoup de larves, d'adultes, d'œufs du doryphore en automne, à la fin des cultures en champs, pour démarrer un élevage en laboratoire.

En laboratoire, tout d'abord, les plants de pomme de terre sont cultivés en pots dans une chambre de croissance avec éclairage et température adéquates à leur croissance. Les pots de plants de pomme de terre sont placés dans une cage dont les parois latérales sont en plexiglass et le sommet fermé par un cadre en mousseline afin d'éviter la fuite des

**FIGURE 4**

**PHOTOGRAPHIE ILLUSTRANT  
L'ÉLEVAGE D'ADULTES ET DE LARVES  
DE DORYPHORE EN LABORATOIRE**



**FIGURE 5**

**PHOTOGRAPHIE ILLUSTRANT L'ÉLEVAGE À PARTIR  
D'OEUF DE DORYPHORE EN LABORATOIRE**





doryphores (Figure 4). Ceux-ci (grosses larves et adultes) sont déposés sur la plante et se nourrissent de ses feuilles dans des conditions de température, d'éclairage et d'humidité contrôlées: 22 à 24 °C, 16:8 heures, 60 à 70%. Les oeufs, ont été mis dans un recipient en plastique qui était aussi fermé au sommet par un cadre en mousseline afin d'éviter la sortie de jeunes larves de doryphore; elles se sont nourries des feuilles du plant de pomme de terre (Figure 5). Les conditions climatiques d'élevage sont les mêmes qu'avec l'élevage d'adultes du doryphore. Quant les larves sont suffisamment grosses, elles sont transférées sur les plants de pomme de terre avec les adultes pour la fin de leur croissance et leur vie adulte.

### 2.3. LA CULTURE CELLULAIRE DE DORYPHORE

En ce qui concerne la culture de cellules d'insectes, outre l'emploi de culture de cellules d'insectes courant en arbovirologie (Payment et Trudel, 1989), les lignées cellulaires d'insectes ont permis l'évolution de la pathologie des insectes, comme l'isolement et l'étude au niveau cellulaire de germes entomopathogènes, de virus, de toxines bactériennes et fongiques. Surtout, les cultures cellulaires d'insecte ont été démontrées être un substitut valable de l'insecte pour évaluer des pathogènes tel que les virus (Belloncik et al., 1989; McIntosh et al., 1985), les bactéries (*Bacillus thuringiensis*) (Masson et al., 1989; Johnson, 1981 et 1987; Nishiitsutsujiuwo et al., 1980; Gringorten et al., 1990).

### 2.3.1. LE CHOIX DES MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE

Les milieux de culture cellulaire comprennent des composantes organiques et inorganiques tels des sels, des sucres et des acides aminés etc... Chaque composante de ceux-ci est contenue en une quantité spécifique pour la culture cellulaire de chacune des différents espèces d'insectes (Kruse et Patterson, 1973). De plus le pH du milieu obtenu après l'ajout des diverses composantes doit être ajusté à un pH optimum pour la croissance des cellules de l'insecte en question. Aussi, les milieux ont besoin de l'ajout d'une solution à 1 % d'antibiotique (mélange pénicilline et streptomycine) pour éviter la contamination du milieu de culture cellulaire par des bactéries (Wyatt et Wyatt, 1980; Grace, 1982; Payment et Trudel, 1989).

Les milieux qui sont utilisés pour la croissance de cellules d'animaux et d'insectes sont sous forme liquide ou en poudre et sont disponibles commercialement (Butler, 1988).

Pour le choix des milieux de culture de cellules de doryphore, nous nous sommes référés aux catalogues de compagnies de produits de cultures cellulaires et nous avons utilisé plusieurs milieux qui nous apparaissaient propices les meilleurs pour les cultures cellulaires d'insecte (Tableau 1): #1. milieu EX-CELL 400 (JRH BIOSCIENCES) additionné de 20% de sérum de veau foetal (GIBCO), 1% de mélanges des lipides (SIGMA) et 1% d'antibiotiques (6,13 *mg/ml* de penicilline et 13,5 *mg/ml* de

TABLEAU 1: MILIEUX DE CULTURE DE CELLULES UTILISÉS  
POUR L'OBTENTION DE PRIMO-CULTURES

MILIEUX	SÉRUM DE VEAU FOETAL	AUTRES	pH
EX-CELL 400	20%	1 % mélange de lipides 1 % antibiotiques	7.0
EX-CELL 400	5%	1 % antibiotiques	6.8
GRACE	20%	1 % antibiotiques	6.3
TC10	20%	1 % antibiotiques	6.5
M3	10%	1 % antibiotiques	6.4
M3	20%	1 % antibiotiques	6.8
RPMI 1640	10%	1 % antibiotiques	6.8
RPMI 1640	20%	1 % antibiotiques	7.0
IPL-41	10%	1 % antibiotiques	6.3
IPL-41	20%	1 % antibiotiques	6.5
MOUSTIQUE	10%	1 % antibiotiques	6.4
MOUSTIQUE	20%	1 % antibiotiques	6.8
SCHNEIDER'S	10%	1 % antibiotiques	6.7
SCHNEIDER'S	20%	1 % antibiotiques	7.0
MITSUHASHI- MARAMOROSCH	10%	1 % antibiotiques	6.5

streptomycine); #2. milieu EX-CELL 400 additionné de 5 % de sérum de veau foetal et 1 % d'antibiotiques; #3. milieu GRACE (SIGMA) additionné de 20 % de sérum de veau foetal et 1 % d'antibiotiques; #4. milieu TC 10 (GIBCO) additionné de 20 % de sérum de veau foetal et 1 % d'antibiotiques; #5. milieu M3 (SIGMA, SHIELDS AND SANG M3) additionné de 10 % ou 20 % sérum de veau foetal et 1 % d'antibiotiques; #6. milieu RPMI 1640 (GIBCO) additionné de 10 % ou 20 % sérum de veau foetal et 1 % d'antibiotiques; #7. milieu de MOUSTIQUE (GIBCO) additionné de 10 % et 20 % sérum de veau foetal et 1 % d'antibiotiques; #8. milieu IPL-41 (GIBCO) additionné de 10 % ou 20 % de sérum de veau foetal et 1 % d'antibiotiques; #9. milieu de DROSOPHILE DE SCHNEIDER (GIBCO) additionné de 10 % ou 20 % de sérum de veau foetal et 1 % d'antibiotiques; #10. milieu de MITSUHASHI-MARAMOROSCH (GIBCO) additionné de 10 % de sérum de veau foetal et 1 % d'antibiotiques. Tous ces milieux étaient nécessaires puisque nous ne connaissions pas au départ le milieu optimum pour démarrer les lignées cellulaires des divers stades du doryphore.

### 2.3.2. PRIMO-CULTURE

La méthode de culture de cellules se divise habituellement en deux étapes, soit la période de la primo-culture et la période de passages subséquents de la culture cellulaire.

L'étape de primo-culture est établie par une inoculation dans un milieu de fragments

de tissus vivants qui sont pris directement de l'animal ou de l'insecte (Butler, 1988).

En ce qui concerne la culture de cellules de l'oeuf, on utilise une technique comparable à celles de Lynn (1989) et Dübendorfer et Liehig (1992). Afin d'éviter toute contamination, avant d'employer les oeufs embryonnés de doryphore pour les cultures de cellules, la surface des oeufs a besoin d'être stérilisée avec une solution d'eau de Javel (6% d'hypochlorite de sodium) pendant 2 minutes et une solution d'antibiotiques (6,13 *mg/ml* de penicilline et 13,5 *mg/ml* de streptomycine) pendant 3 minutes.

Pour chaque boîte ou Pétri de culture cellulaire, on a employé 10 à 20 oeufs. Lors de la stérilisation pendant une minute avec la solution d'eau de Javel, on ajoute également une goutte de Tween 80, agent mouillant qui réduit la tension de surface et permet un meilleur contact avec l'agent stérilisant tout en détachant les oeufs les uns des autres. Après la stérilisation, les oeufs sont lavés une fois avec du milieu de culture de cellules, puis les oeufs sont immergés dans la solution d'antibiotiques (6,13 *mg/ml* de penicilline et 13,5 *mg/ml* de streptomycine) pendant une minute et sont lavés avec du milieu de culture de cellules encore; enfin, ils sont coupés et triturés en morceaux avec un mini-scalpel (fragments de lame de rasoir montés sur un porte-aiguille) sous le microscope binoculaire.

En ce qui concerne la culture de cellules d'adultes et de larves, on prélève de l'hémolymph de d'adultes ou de larves. Les surfaces ont aussi besoin d'être stérilisées avec

une solution de 70% d'alcool éthylique dans laquelle on immerge l'insecte pendant 2 minutes. Par la suite, on utilise une aiguille pour piquer le côté de l'abdomen ou le côté du thorax de l'adulte ou de la larve et on prélève avec une pipette Pasteur stérile moins d'un millilitre d'hémolymph par larve ou adulte.

L'ensemble de ces opérations sont effectuées dans une hotte stérile et le manipulateur porte des gants stériles et un masque de chirurgie.

Les morceaux d'œufs triturés ou d'hémolymph prélevés d'adultes ou de larves, sont cultivés dans des Pétris (35mm x 10mm) ou des boîtes (25cm<sup>2</sup>) Falcon de culture de cellules avec 1 ml ou 2 ml du milieu frais de culture de cellules. Les Pétris contenant les cultures primaires seront scellés avec du papier de paraffine et transférés ensemble avec les boîtes de culture cellulaire dans un incubateur à 28°C. On observe régulièrement l'aspect des primo-cultures au microscope inversé.

Après environ sept jours, les fragments de tissus vont commencer à se développer par multiplication cellulaire (Ducros et al., 1991). Dans les heures ou la journée qui suit la mise en culture, des fragments de tissus ou des cellules se fixent à la surface de plastique du Pétri ou de la boîte Falcon.

A ce stade se termine la procédure de la primo-culture de culture cellulaire.

### 2.3.3. SOUS-CULTURE

Les cultures secondaires ou sous-cultures sont établies à partir de la primo-culture ou culture primaire (Bulter, 1988).

Pour la sous-culture de suspension cellulaire, il faut changer le milieu de culture environ une fois tous les sept jours et il faut effectuer une dilution de la densité cellulaire avec du milieu frais, jusqu'à la concentration voulue de cellules (Bulter, 1988). La moitié des cellules vont successivement être partagées dans d'autres boîtes auxquelles on ajoute du milieu neuf, ce qui constitue un passage en culture de cellule. C'est la sous-culture (Ducros et al., 1992).

Pour les primo-cultures des cellules de doryphore, après le démarrage de la primo-culture, on a ajouté du milieu neuf (1.5 *ml*) une fois à toutes les semaines et lorsque le volume du milieu a atteint 3 *ml* (dans un pétri) ou 5 *ml* (dans une boîte), 2 *ml* sont remplacés par du nouveau milieu complet. On enlève donc 2 *ml* du vieux milieu de culture que l'on centrifuge, puis on reprend le culot de cellules ou fragments avec du milieu neuf, et on rajoute le tout dans la bouteille (boîte) de primo-culture. Quand le tapis de cellules devient confluent il faut que les cellules soient divisées en deux lots avec du milieu frais. On détache délicatement les cellules par pipetage, puis on partage les moitiés dans deux boîtes, et l'on ajoute une moitié de milieu frais soit environ 2 *ml*. Ce qui constitue un



passage ou une sous-culture. Plus il y a de passages de cultures de cellules, plus la culture se stabilise.

Toutes les manipulations pour les cultures des cellules sont effectuées sous la hotte à flux laminaire et en utilisant des instruments stériles.

## 2.4. LA CARACTÉRISATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE PERMANENTE OBTENUE

Pour bien caractériser les lignées cellulaires permanentes obtenues sur ses aspects morphologiques et physiologiques avant l'étude des effets des entomopathogènes qui sera effectuée, on a caractérisé la morphologie cellulaire en microscopie optique et électronique, puis déterminé le caryotype et le temps de doublement.

### 2.4.1. MORPHOLOGIE CELLULAIRE EN MICROSCOPIE OPTIQUE

La morphologie cellulaire d'un insecte se divise normalement en cinq types caractérisés soit par des cellules épithéliales, des cellules fibroblastiques, des cellules musculaires, des cellules nerveuses et des cellules de l'hémolymphe (Balter, 1988). On peut observer la morphologie cellulaire avec le microscope optique inversé. On a pris les photos de morphologie cellulaire en microscopie optique inversée (Figure: 7.).

#### 2.4.2. MORPHOLOGIE CELLULAIRE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

L'ultrastructure des lignées cellulaires a été étudiée également en microscopie électronique. Une boîte de cellules de la lignée démarrée d'hémolymphes d'adultes de doryphore (DA1) au 30<sup>ième</sup> passage et presque confluyente est vidée délicatement du milieu de culture. Le tapis cellulaire est fixé avec une solution de 4% de glutaraldéhyde dans une solution tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4) 30 minutes à la température de la pièce. La solution de fixateur est remplacée par une solution fraîche et le tout incubé une demi-heure à la température de la pièce puis placé à 4 °C pour 24 heures. On lave par la suite le tapis cellulaire trois fois avec du tampon cacodylate sans fixateur. Chaque bain de lavage dure une demi-heure. Le tout est suivi d'une post-fixation au tétroxyde d'osmium à 2% dans la même solution tampon pendant une heure à la température de la pièce. On lave rapidement le tapis à l'eau distillée. Le tapis cellulaire est gratté du support de plastique de la boîte de culture à l'aide d'un policeman et le liquide restant contenant les fragments du tapis cellulaire transféré dans des tubes Eppendorf. On centrifuge à 1000 r.p.m. 5 minutes.

Les processus de déshydratation et d'enrobage sont effectués de la manière suivante: premier bain d'acétone à 50% pendant 10 minutes; deuxième bain d'acétone à 70% pendant 10 minutes; préinclusion des cellules dans l'agar à 1%; le culot de cellules après centrifugation dans l'agar liquide est récupéré et refroidi puis coupé en morceaux d'environ 1 mm<sup>3</sup>; troisième bain d'acétone à 90% pendant 10 minutes; quatrième bain d'acétone à

100% pendant 10 minutes. Les deux bains suivants sont dans de l'oxyde de propylène pendant 10 minutes chacun. Un bain de 50% d'oxyde de propylène et de 50% d'Epon suit. Un bain d'Epon pur par la suite pendant une nuit, et on fait la polymérisation des blocs 24 heures à 60°C. Des coupes de ces blocs sont effectuées à l'ultramicrotome et récupérées sur grille puis colorées par une double imprégnation à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (Reynolds, 1963). L'observation et la prise de microphotographies ont été faites sur un microscope électronique EM Zeiss 10 CR sous 80 Kvolts.

Toute cette procédure de microscopie électronique a été réalisée pour nous par le service de microscopie électronique de la Station de Pathologie Comparée de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) à Saint-Christol-les-Alès, France (Figure: 8).

#### 2.4.3. ANALYSE DU CARYOTYPE

Le nombre des chromosomes est déterminé pour chaque lignée cellulaire par un protocole similaire à celui de Schneider (1973). Les cellules sont incubées de 18 à 24 heures à 28°C dans du milieu de culture qui contient 50  $\mu\text{g/ml}$  de colchicine (SIGMA). Les cellules sont détachées de la surface de la boîte par pipettage puis centrifugées dans un tube à essai stérile à 3,000 r.p.m. pour 10 minutes dans une centrifugeuse de table. Le culot de cellules est repris dans de l'eau distillée pour un premier lavage et laissé à la température

de la pièce 10 minutes pour permettre également le gonflement des cellules. Une deuxième centrifugation est suivie d'une deuxième période de lavage de 10 minutes à la fin de laquelle on recentrifuge les cellules en suspension. La fixation des cellules est effectuée avec 2,5 *ml* d'une solution d'acide acétique glacial additionné de 95 % de méthanol (alcool méthylique) (1:3) dans laquelle on resuspend le culot de cellules et on incube 15 minutes. Après la période de fixation, on procède à une dernière centrifugation, et on resuspend le culot de cellules dans la solution de coloration des chromosomes soit la solution d'orcéine (Annexe: 1). On incube de 15 minutes à 24 heures. Une goutte du culot coloré est mise sur une lame de microscope et couverte avec une lamelle. On enlève le liquide résiduaire avec du papier. Pour étaler les chromosomes, on fait éclater les cellules en tapant avec la gomme d'un crayon sur la lamelle et on observe au microscope.

#### 2.4.4. TEMPS DE DOUBLEMENT

Nous démarrons avec une concentration de 35,000 cellules par millilitre de milieu de culture cellulaire dans des Pétris (35mm x 10mm) et chaque Pétri reçoit 1 millilitre de suspension de cellules. Les Pétris sont incubés à 28°C. Les cellules sont détachées des Pétris par pipettage successifs puis les cellules de cette suspension sont colorées au violet cristal (Annexe: 2) soit une partie de suspension de cellules avec une partie de colorant, le violet cristal qui peut colorer les cellules vivantes (Payment et Trudel, 1989), pendant 2 à 3 minutes. On a dénombré les cellules dans 3 Pétris à chaque jour à l'aide de l'hématimètre

(Annexe: 3). À la fin l'expérience, à l'aide d'une courbe de la croissance de cellules, on peut déterminer le temps de doublement par un calcul voir Annexe: 4. Ce temps de doublement a été mesuré pour chaque lignée et après divers nombres de passages.

## 2.5. DOSAGE DE L'EFFET CYTOLYTIQUE DE TOXINES DE SOUCHES DE BACILLUS THURINGIENSIS SUR LES CELLULES DE LA LIGNÉE PERMANENTE OBTENUE D'ADULTES ET DE LARVES DE DORYPHORE

On a utilisé pour ces tests trois préparations commerciales de Bacillus thuringiensis spécifiques pour le doryphore; le M-ONE® à base de la variété San Diego de Mycogen Corporation, le MYX 1806® à base de la même variété mais manipulée génétiquement, et le TRIDENT® à base de la variété tenebrionis de Sandoz Agro Canada, Inc. On a également utilisé à titre de comparaison une formulation commerciale de la variété israelensis spécifique pour diptères, le TEKNAR-HPD® de Zoecon Canada Inc.; la même compagnie a fourni un "Blank®" formulé avec les ingrédients inertes du TEKNAR-HPD®; et finalement une formulation commerciale le THURICIDE® (marque déposée de Sandoz inc.) à base de la variété kurstaki spécifique pour lépidoptères, qui provient de C.I.L. (Tableau 2).

TABLEAU 2: DIVERSES SOUCHES DE BACILLUS THURINGIENSIS  
ET BLANK UTILISÉES

NOM COMMERCIAL	SOUCHE DU <u>B.T.</u>	COMPAGNIE
M-ONE®	San Diego	Mycogen Corporation
MYX1806®	San Diego	Mycogen Corporation
TRIDENT®	tenebrionis	Sandoz Agro Canada Inc.
TEKNAR-HPD®	israelensis	Zoecon Canada Inc.
THURICIDE®	kurstaki	C.I.L.
BLANK®	aucune	Zoecon Canada Inc.

### 2.5.1. LA SOLUBILISATION DES TOXINES

Pour avoir un effet toxique en culture cellulaire les cristaux toxiques pour les insectes doivent être dissous en fragments toxiques. On a utilisé la technique de Thomas et Ellar (1983) modifiée. Les cristaux sont dissous par l'addition d'un volume égal de 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 10.5) à 100 *mg/ml* de préparations commerciales ou de "Blank" et incubation à 37°C pour 24 heures. La solution est alors neutralisée par du HCl (5 M) et centrifugée pour éliminer le matériel insoluble à l'aide d'une centrifugeuse Sorvall RC 5 (tête ss-34) à une vitesse de 12,000 R.P.M./minute pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est filtré sur filtre de porosité 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore).

### 2.5.2. DOSAGE DES PROTÉINES DES SURNAGEANTS DE SOLUBILISATIONS

Afin de quantifier les tests, un dosage de protéines est effectué par la méthode Bio-Rad qui consiste en une technique de quantification des protéines par spectrophotométrie. L'albumine bovine servira de témoin pour établir une courbe standard (D.O. vs  $\mu\text{g}$  de protéine) au préalable. On a utilisé la procédure du microessai de Bio-Rad (Anonyme, 1979) (Annexe 5). Elle est faite sur chacune des solutions dissoutes.

### 2.5.3. LE TEST DE CYTOTOXICITÉ EN CULTURE DE CELLULES DE DORYPHORE

Les cellules qui sont des substitut de l'insecte ont été souvent utilisées pour effectuer des essais biologiques avec Bacillus thuringiensis depuis les années 70. L'étude par cette technique du mode d'action de la toxine du B.t. peut représentée l'activité de la toxine "in vitro" (Himeno et al., 1985; Johnson, 1981 et 1987).

#### 2.5.3.1. LA MÉTHODE D'ESSAI CYTOTOXIQUE CLASSIQUE

Les cellules d'une boîte de culture d'une lignée cellulaire permanente obtenue du doryphore sont détachées du plastique par pipettage et 150  $\mu l$  de la suspension cellulaire à une concentration de 35,000 cellules /  $ml$  sontensemencés dans chacun des puits d'une microplaque de culture de cellules à 96 puits (Falcon, Corning). Les microplaques sont incubées 24 heures à 28°C avant l'ajout de 50  $\mu l$  des différentes dilutions des solutions de toxines dissoutes avec du milieu de culture frais. La concentration de protéine à une dilution donnant 50% de puits avec de la lyse de cellules est calculée après 24 heures en utilisant la méthode de calcul de la DTCT50 (Dose toxique en culture de tissu pour 50% des puits avec la lyse) (Annexe 6) (Payement et Trudel, 1989). On peut alors trouver la dose toxique à 50% de toxines de chacun des B.t. et les comparer entre elles.



#### 2.5.3.2. LA MÉTHODE D'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ PAR MESURE DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE PAR MARQUAGE ET DéTECTION DU 5-Bromo-2'-Deoxy-Uridine (BrdU)

La méthode de mesure de la viabilité cellulaire par incorporation du BrdU à l'ADN cellulaire en cours de synthèse et détection par la suite à l'aide du KitIII, est une nouvelle méthode remplaçant la technique de dénombrement et d'observation visuelle peu sensible et les techniques utilisant des marqueurs de viabilité radioactifs à savoir la thymidine tritiée ou le chrome 51. La BrdU est incorporée à l'ADN dans les cellules en division active à la place de la thymidine. Suite à la fixation des cellules, la BrdU peut être détectée par un anticorps spécifique couplé à un marqueur, la peroxydase, puis une réaction avec le substrat de cet enzyme.

Des cellules en croissance ayant une concentration à 200,000 cellules par millilitre sont ajoutées à raison de 75  $\mu$ l dans chacune des cupules d'une microplaque et incubées à 28°C pendant 3 jours. On a remplacé le vieux milieu avec 75  $\mu$ l de milieu neuf de culture cellulaire et également on a ajouté 25  $\mu$ l par cupule de différentes dilutions des solutions de toxines dissoutes avec du milieu de culture cellulaire et puis incubées pendant 24 heures. On a calculé la DTCT50 du B.t. et on a ajouté 10  $\mu$ l de la solution du BrdU. Le BrdU est un analogue de nucléotide qui est incorporé dans les ADN à la place de thymidine lors de la synthèse de l'ADN. Le test de mesure de la croissance de cellules est effectué à 4 jours

après la incorporation du BrdU. La méthode est la suivante:

1. FIXATION DE CELLULES: Pour préserver les synthèses initiales d'ADN, les cellules sont arrêtées par l'addition d'un fixateur (1:3 d'acide citrique et d'éthanol à 70%) après un certain temps de croissance. On enlève les solutions dans les puits, on ajoute 200  $\mu$ l par puits de fixateur prérefroidit et on laisse la microplaque au réfrigérateur à -20°C pendant 30 minutes.

2. NETTOYAGE DE CELLULES: Après avoir enlevé la solution de fixation, on lave les cellules 3 fois avec 250  $\mu$ l par puits de milieu ou de P.B.S. (Annexe 7) qui contient 10% de sérum.

3. ADDITION DES NUCLÉASES: L'ADN des cellules est partiellement digéré par des nucléases (ADNase et ARNase) pour une meilleure détection. Les cellules sont incubées avec 100  $\mu$ l par puits de la solution de travail de nucléase à 28°C pendant 30 minutes.

4. LAVAGE DE CELLULES: Après avoir enlever la solution de nucléase, on lave les cellules 3 fois avec 250  $\mu$ l par puits de milieu ou de P.B.S. qui contient 10% de sérum.

5. ADDITION D'ANTI-BrdU-POD: Un anticorps anti-BrdU couplé à la peroxydase réagit avec le BrdU present dans l'ADN. On ajoute 100  $\mu$ l par puits de la solution de

travail d'Anti-BrdU-Pod (fragments fab) et les cellules sont incubées à 28°C pendant 30 minutes.

6. NETTOYAGE DE CELLULES: Les cellules sont lavées 3 fois avec 250  $\mu$ l par puits de tampon après avoir enlevé les solutions de l'Anti-BrdU-Pod.

7. ADDITION DU SUBSTRAT ABTS DE LA PEROXIDASE®: Le peroxydase réagit avec son substrat l'ABTS® et forme un complexe enzyme-substrat. D'autre part, la peroxydase catalyse le substrat ABTS® pour donner un produit de réaction coloré. On additionne donc 100  $\mu$ l par puits de la solution du substrat de la peroxydase mélangée avec l'amplificateur du substrat au préalable. On incube à la température de la pièce jusqu'à l'apparition de couleur verte de cette solution environ 2 à 30 minutes.

8. LECTURE AU SPECTROPHOTOMÈTRE DE LA RÉACTION AVEC LE SUBSTRAT: On peut utiliser un lecteur d'ELISA pour mesurer l'absorbance. On peut mesurer donc la quantité du substrat ABTS® utilisée par la peroxydase. On peut donc quantifier la proportion de cellules viables qui ont synthétisé de l'ADN dans nos cultures. La microplaque est mise dans le lecteur d'ELISA et lue à la longueur d'onde 405 nm et à celle de référence à 490 nm; on peut également obtenir les résultats des DL50 des toxines du B.t..

#### 2.5.4. LA COMPARAISON DE LA CYTOTOXICITÉ DE TOXINES DE DIVERSES SOUCHES DU B.T. SUR LES CELLULES DA1 AVEC TRAITEMENT À LA TRYPSINE ET SANS TRAITEMENT

Lors du test de la solubilisation des toxines du B.t., nous avons fait le traitement avec la trypsine pour essayer d'augmenter la cytotoxicité de toxines de B.t. afin de faciliter la détection de faibles quantités de toxines. Les cristaux sont dissous par l'addition d'un volume égal de 0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 10,5) à 100 *mg/ml* de préparations commerciales ou de "Blank" et incubation à 37°C pour 24 heures. La solution est neutralisée par du HCl (5M). À ce moment, une moitié de la solution neutralisée est mélangée avec 40  $\mu\text{g}$  de trypsine par millilitre de la solution de solubilisation des toxines du B.t. ou "Blank" pendant 2 heures. Puis la solution traitée est centrifugée pendant 30 minutes à 4°C à 12,000 R.P.M. par minute. À la fin, le surnageant est filtré sur filtre de 0,45  $\mu\text{m}$  de millipore. L'autre moitié de solution non-traitée avec la trypsine a été centrifugée et filtrée après la neutralisation.

Pour le test de l'évaluation de cytotoxicité de toxines de B.t. en culture de cellules de doryphore DA1, nous avons utilisé la même technique soit la méthode d'essai de cytotoxicité classique.

## **CHAPITRE III**

## RÉSULTATS ET ANALYSES

### 3.1. COLLECTE ET ÉLEVAGE DE DORYPHORES

#### 3.1.1. LA COLLECTE D'INSECTES SUR LE TERRAIN

Nous avons collecté des échantillons de doryphores plusieurs fois à partir du mois d'août à septembre 1992 et à l'été 1993. Beaucoup d'œufs, de larves et des adultes de doryphores ont été récoltés directement sur les champs de pommes de terre dans la région de Trois-Rivières et ramenés au laboratoire pour les essais de culture de cellules et le démarrage d'un élevage en laboratoire (Figure: 2 et 3).

#### 3.1.2. LA CONSERVATION EN LABORATOIRE DES INSECTES RÉCOLTÉS

Après la récolte des doryphores, nous avons commencé les essais de culture de cellules à partir des trois formes du doryphore (œuf, larve et insecte adulte) et démarré l'élevage en laboratoire. Mais, souvent on ramenait trop de doryphores. Il fallait donc ralentir leur développement et les conserver avant utilisation. Nous les avons donc conservés au réfrigérateur à 4°C, 40 à 50% d'humidité, et sans lumière avec comme nourriture du feuillage de pomme de terre dans un pot de plastique (20cm x 14cm x 12cm)

## **FIGURE 6**

**Photographie illustrant la conservation du doryphore au réfrigérateur. Les adultes sont conservés à 4° C dans un récipient en plastique qui était aussi fermé au sommet par un cadre en mousseline avec un peu de feuillage de plant de pomme de terre.**





avec un couvert ayant une fenêtre de mousseline. Les doryphores peuvent être conservés au moins un mois de cette manière. (Figure: 6)

### 3.1.3. LE DÉMARRAGE D'UN ÉLEVAGE EN LABORATOIRE

A l'automne 1992, nous avons commencé à démarrer l'élevage de doryphores en laboratoire afin d'avoir beaucoup de doryphores à utiliser, notamment en hiver. Les adultes de doryphores ramenés du champ, s'élèvent sur les plants de pomme de terre en laboratoire. Ils s'accouplent par la suite. Une semaine plus tard, les femelles adultes pondent des masses d'œufs sous les feuilles. Le nombre d'œufs d'une masse est variable. Elle peut comprendre 30 à 50 œufs. Les œufs proviennent soit de récoltes en champs ou sont déposés par les femelles adultes sur les plants de l'élevage. Les œufs éclosent après une semaine donnant le premier stade larvaire sur la masse d'œufs. Ces larves se nourrissent du feuillage du plant de pomme de terre. Les larves provenant du champ et de l'éclosion sont mises sur les plants de pomme de terre. Lorsqu'elles sont plus grosses au 4<sup>ième</sup> stade larvaire, elles tombent et s'enfoncent dans le sol, se transformant en nymphes et émergent sous forme adulte environ 10 à 15 jours plus tard. Donc nous avons pu reproduire en laboratoire le cycle de vie complet du doryphore. Ceci peut nous fournir des doryphores en tout temps. De septembre 1992 à mai 1993, nous avons obtenu quatre générations d'adultes de doryphore, trois générations d'adultes de juin à septembre 1993 et trois générations d'adultes d'octobre 1993 à avril 1994.

C'est grâce à cet élevage en laboratoire que nous avons pu obtenir suffisamment d'œufs de doryphore pour démarrer une culture cellulaire à partir d'œufs embryonnés de l'insecte puisque nous n'en avons pas une quantité suffisante provenant des récoltes sur le terrain pour procéder à cette mise en culture. (Figure: 4 et 5)

### 3.2. ÉTABLISSEMENT DES LIGNÉES DE CELLULES DE DORYPHORE

#### 3.2.1. CHOIX DU MEILLEUR MILIEU

Pour choisir les milieux de culture de cellules, nous avons, au préalable, utilisé les milieux (Tableau: 1) qui sont habituellement employés pour les cultures de cellules d'insectes.

En ce qui concerne les facteurs favorisant la croissance des cellules de doryphore, en plus des suppléments nutritifs pour la croissance tels que le sérum foetal de veau et les lipides, on a aussi envisagé l'influence d'un facteur comme le pH. Nous avons donc mesuré le pH des milieux de culture cellulaire (voir tableau 1) pour savoir si le pH des divers milieux était compatible avec le pH du milieu corporel du doryphore. Nous les avons comparés avec les données de Pelletier et Clark (1992). Ils donnent un pH de l'hémolymphe d'adulte de  $6,53 \pm 0,01$  pour le mâle, de  $6,6 \pm 0,03$  pour la femelle, et pour l'hémolymphe de la larve de  $6,58 \pm 0,02$ . Ces valeurs de pH des divers stades de

l'insecte sont compatibles avec les pH de nos divers milieux de cultures.

Nous avons testé tous ces milieux de cultures (voir tableau 1) lors des essais de mise en culture de cellules de doryphore pour l'obtention de primo-cultures. Une première série d'essais a été effectuée avec les oeufs, les larves et les adultes de doryphore d'abord de juillet à décembre 1992, puis une autre série avec les larves et les oeufs à l'été et à l'automne 1993. Nous avons obtenu des résultats intéressants avec deux de ces milieux. Nous avons réussi à établir des lignées cellulaires de doryphore dans les milieux Ex-CELL 400 et M3.

Les milieux des lignées de cellules établies sont:(voir tableau: 3)

**#1.** La culture de cellules à partir d'hémolymph de d'adultes (DA1 et DA2) est maintenue dans le milieu EX-CELL 400.

**#2.** La culture de cellules à partir d'hémolymph de larves (DL1) est aussi maintenue dans le milieu EX-CELL 400.

**#3.** La culture de cellules à partir de fragments d'oeufs embryonnés (DO1) est maintenue dans le milieu M3 (SHIELDS et SANG M3).

### 3.2.2. OBTENTION DES LIGNÉES CELLULAIRES PERMANENTES

Lors de la primo-culture des fragments oeufs embryonnés, les fragments d'oeufs sont cultivés dans une boîte avec du milieu de culture et ils se sont attachés à la surface de boîte plastique. On a pu voir par la suite que des vésicules sont apparues au bout des fragments, ou que des cellules se sont étalées autour du fragment et se sont divisées par la suite.

Pour la culture de l'hémolymph, au début, il y a eu apparition dans certaines boîtes d'une couleur brunâtre dans le milieu qui devient très foncé (presque noire) qui est constituée des produits de la mélanisation et divers intermédiaires toxiques qui sont produits par les cellules elles-mêmes. Ils sont toxiques pour les cellules et peuvent les inhiber dans leur croissance. Donc, lorsque l'on a vu la couleur foncée du milieu de culture, on a changé le milieu de culture tout de suite ou jeté cette boîte de culture cellulaire, si la lyse était trop avancée. Cette réaction de mélanisation est vraisemblablement causée par une hyperactivation de la phénol oxydase (Wyatt et Wyatt, 1976).

La primo-culture s'effectue dans la hotte stérile sous un microscope avec les milieux de culture à tester. Pour la culture de cellules à partir de l'hémolymph de larve et d'adulte du doryphore, après la primo-culture, les cellules ont poussé lentement. On a changé 1 ml du milieu pour 1 ml<sup>de</sup> milieu neuf chaque semaine et cette période pouvait durer environ 2

TABLEAU 3: LIGNÉES DE CELLULES DE DORYPHORE  
OBTENUES

LIGNÉE	SOURCE	MILIEU	PASSAGE	STABLE
DA1	adulte	Ex-cell 400 20% sérum de veau foetal 1% de mélange de lipides 1% antibiotiques	70	stable
DA2	adulte	Ex-cell 400 5% sérum de veau foetal 1% antibiotiques	47	stable
DL1	larve	Ex-cell 400 5% sérum de veau foetal 1% antibiotiques	34	stable
DO1	oeuf	M3 10% sérum de veau foetal 1% antibiotiques	20	presque stable

mois. Lorsque les cellules sont confluentes à la surface de la boîte plastique, on a fait un passage de culture de cellules en divisant la boîte-mère en deux boîtes-filles. Au début, 1<sup>er</sup> et 2<sup>ième</sup> mois de sous-cultures, on a fait le passage à tous les 10 à 15 jours. Lorsque l'on dépasse le 40<sup>ième</sup> passage, on fait un passage à chaque semaine ou aux 10 jours. Maintenant au 75<sup>ième</sup> passage de la lignée DA1, on fait un passage après seulement 5 à 6 jours. Au 47<sup>ième</sup> passage de la lignée DA2 le passage est fait aux 8 jours. Pour la lignée DL1 au 38<sup>ième</sup> passage, le passage est fait aux 7 à 10 jours. Pour la culture de cellules à partir d'oeufs embryonnés après la primo-culture, les cellules ont poussé plus lentement que celles à partir de l'hémolymph de larve et d'adulte. Le premier passage est effectué après 2 à 3 mois. Puis les cellules ont encore poussé lentement soit environ 15 jours nécessaires par passage. À ce moment-ci, les cellules d'oeufs au 20<sup>ième</sup> passage, qui sont cultivées dans le milieu M3, poussent lentement soit environ 10 à 15 jours par passage.

Finalement, nous avons obtenu jusqu'à présent 4 lignées de cellules (Tableau: 3).

La première lignée, la lignée DA1, a été premièrement établie le 29 septembre 1992 à partir de l'hémolymph d'adulte. Cette lignée en est maintenant au 70<sup>ième</sup> passage, et est maintenue dans le milieu EX-CELL 400 avec 20% de sérum de veau foetal plus 1% d'un mélange de lipides et 1% d'une solution d'antibiotiques. Elle est la plus stable.

La deuxième lignée, la lignée DA2, qui aussi vient de l'hémolymph d'adulte a été

démarrée le 4 août 1992, et est maintenue dans le milieu EX-CELL 400 additionné de 5 % de sérum de veau foetal et de 1 % d'une solution d'antibiotiques. Nous en sommes au 47ième passage. Elle est aussi stable.

La troisième lignée, la lignée DL1, qui est à partir de l'hémolymph des larves a été démarrée le 22 juillet 1993, et est maintenue dans le milieu EX-CELL 400 additionné de 5 % ou 20% de sérum de veau foetal et 1 % d'une solution d'antibiotiques. Nous en sommes au 34ième passage. Elle est stable.

La quatrième lignée, la lignée DO1, qui vient des fragments d'oeufs embryonnés a été démarrée le 5 septembre 1993, et est maintenue dans le milieu M3 additionné de 10% de sérum de veau foetal et 1 % d'une solution d'antibiotiques. Cette lignée en est maintenant au 20ième passage. Elle sera bientôt considérée comme établie.

Lors du 14ième passage de la lignée DO1, on a changé le milieu de culture du milieu M3 additionné 10% de sérum de veau foetal et 1 % d'une solution d'antibiotiques au milieu EX-CELL 400 plus 20% de sérum de veau foetal et 1 % de mélange de lipides et 1 % d'une solution d'antibiotiques. Par conséquent, les cellules de la lignée DO1 ont poussé plus vite dans le milieu EX-CELL 400 que dans le M3 soit 7 à 10 jours par passage au lieu de 10 à 15 dans le M3. En ce moment, on en est au 23ième passage de cette lignée dans le milieu Ex-CELL 400. Elle sera aussi bientôt stable dans ce milieu.

### 3.3. RÉSULTATS DE LA CARACTÉRISATION DES LIGNÉES CELLULAIRES PERMANENTES OBTENUES

Après que les cellules se sont stabilisées, nous avons fait la caractérisation des lignées cellulaires permanentes obtenues. Cela est pour bien connaître les caractéristiques des lignées des cellules obtenues et par la suite de mieux évaluer les effets des entomopathogènes sur elles.

#### 3.3.1. OBSERVATION DE LA MORPHOLOGIE DES LIGNÉES CELLULAIRES

##### 3.3.1.1. EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Au départ de la primo-culture, beaucoup de vacuoles et de débris existaient dans les boîtes Falcon ou les Pétris notamment pour la culture cellulaire des fragments d'oeufs embryonnés. Après quelques semaines, plusieurs types des cellules se sont étalés sur la surface des boîtes. La culture cellulaire pour les quatre lignées cellulaires présente au début quatre types de morphologie cellulaire en proportions à peu près égales, sauf pour les cellules nerveuses qui proviennent d'oeufs embryonnés. On retrouve donc des cellules de type épithéliales, des cellules de type hémocytes, des cellules de type nerveuse et des cellules de type fibroblastique.



TABLEAU 4: L'OBSERVATION DE LA MORPHOLOGIE DE LIGNÉES  
CELLULAIRES EN MICROSCOPIE OPTIQUE

LIGNÉE	PASSAGE	TYPE DE MORPHOLOGIE
DA1	70	épithéliale, hémocytaire
DA2	47	épithéliale, fibroblastique
DL1	38	épithéliale, hémocytaire
DO1	20	épithéliale, hémocytaire

## **FIGURE 7**

**Photographies (900x) illustrant les types cellulaires de quatre lignées de cellules obtenues en microscopie optique.**

**a) Cellules de la lignée DA1 de doryphore au 73ième passage.**

**On note des cellules épithéliales (►) et des hémocytes (►).**

**b) Cellules de la lignée DA2 de doryphore au 43ième passage avec des cellules fibroblastiques (►) et épithéliales (►).**

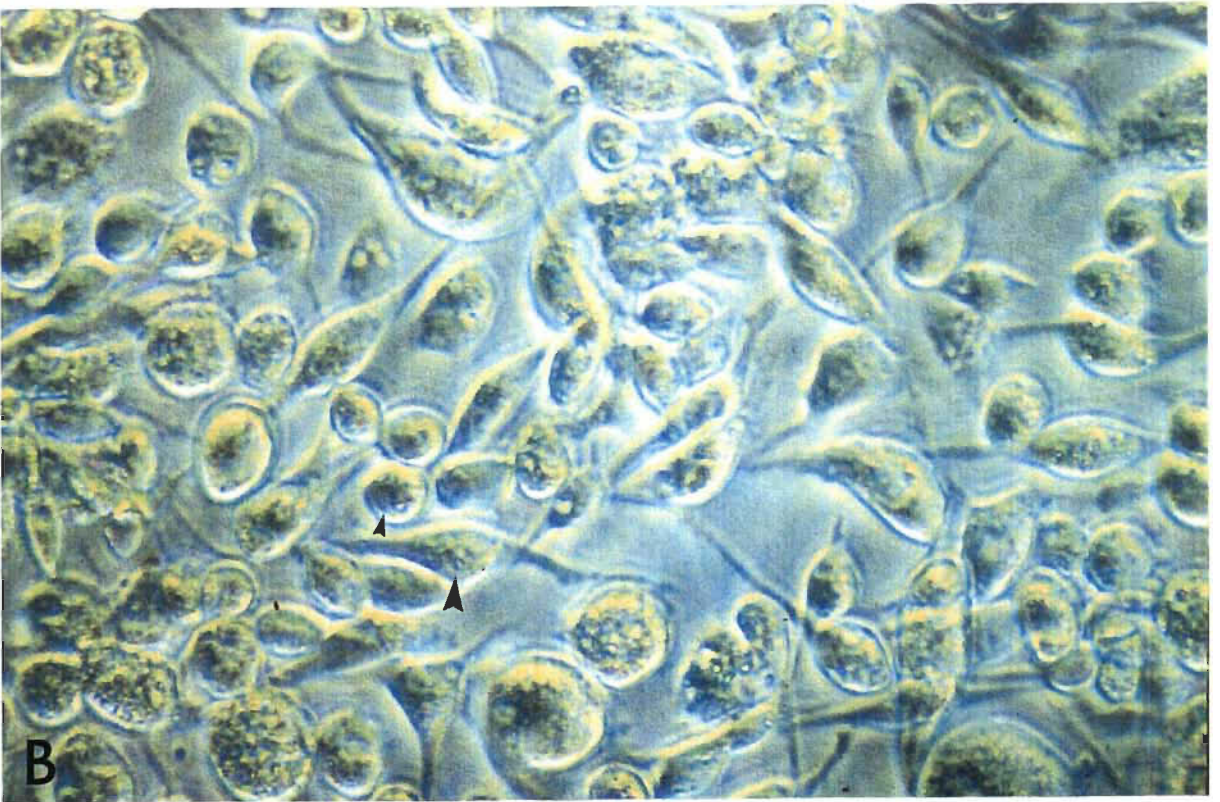
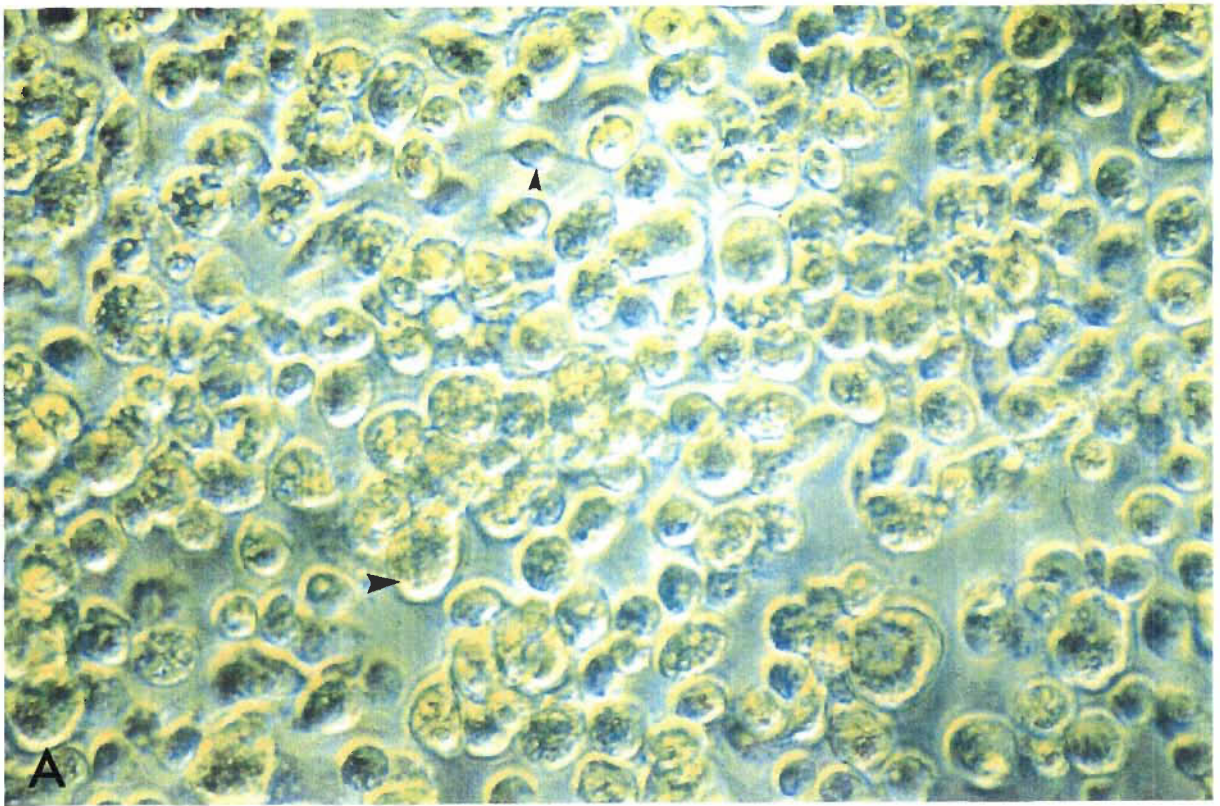
**c) Cellules de la lignée DL1 de doryphore au 34ième passage.**

**On note des cellules épithéliales (►) et des hémocytes (►).**

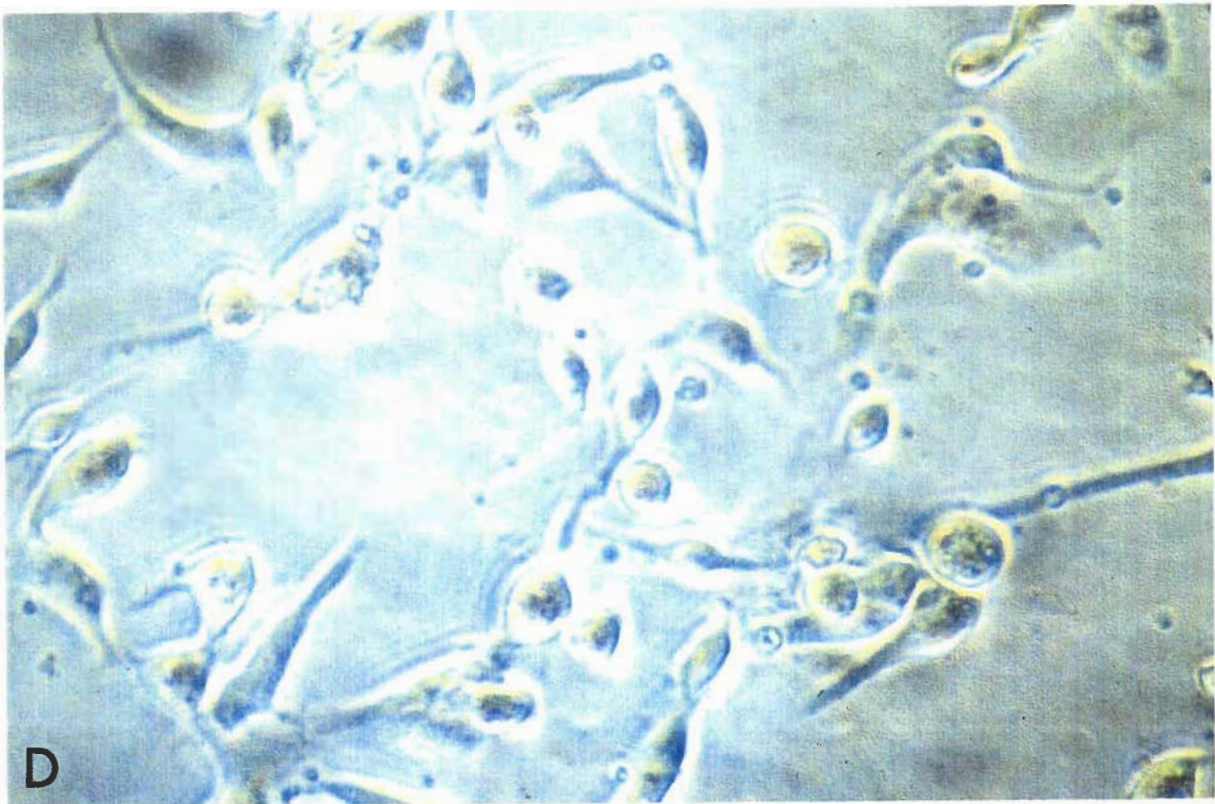
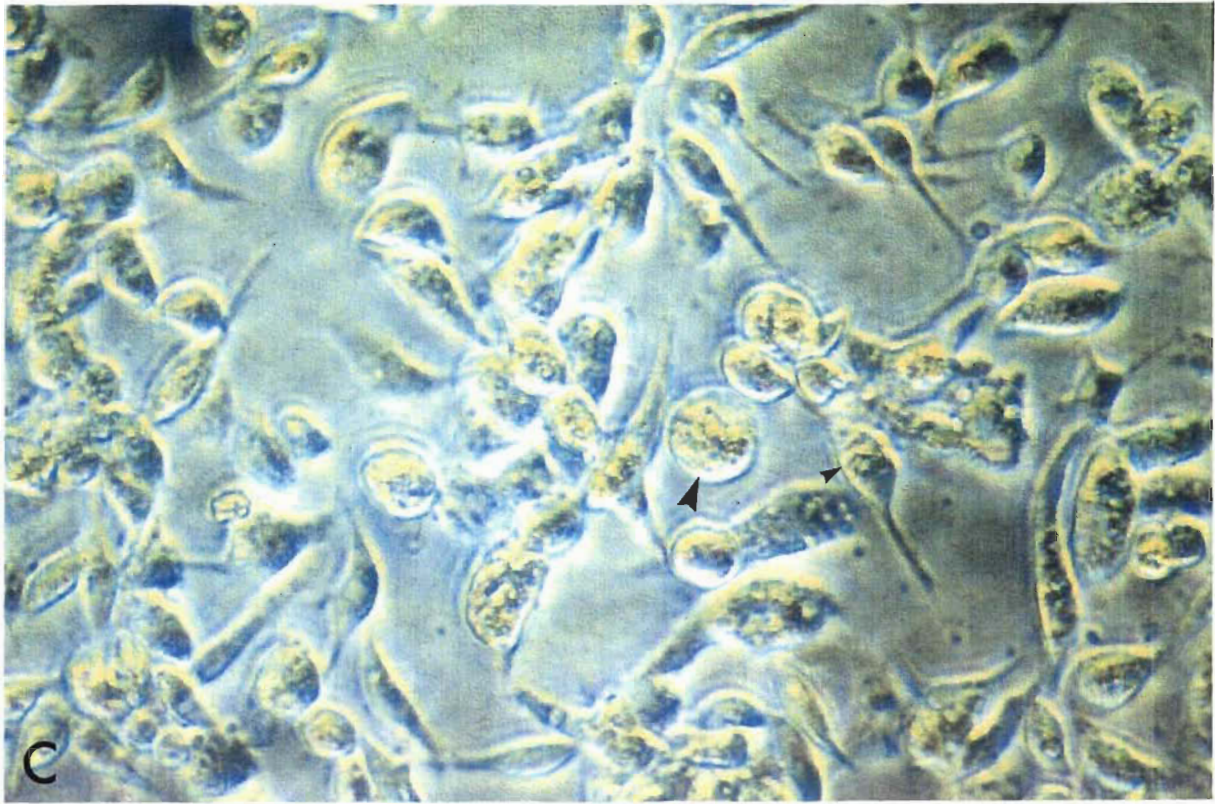
**d) Cellules de la lignée DO1 de doryphore au 18ième passage avec les mêmes types cellulaires.**

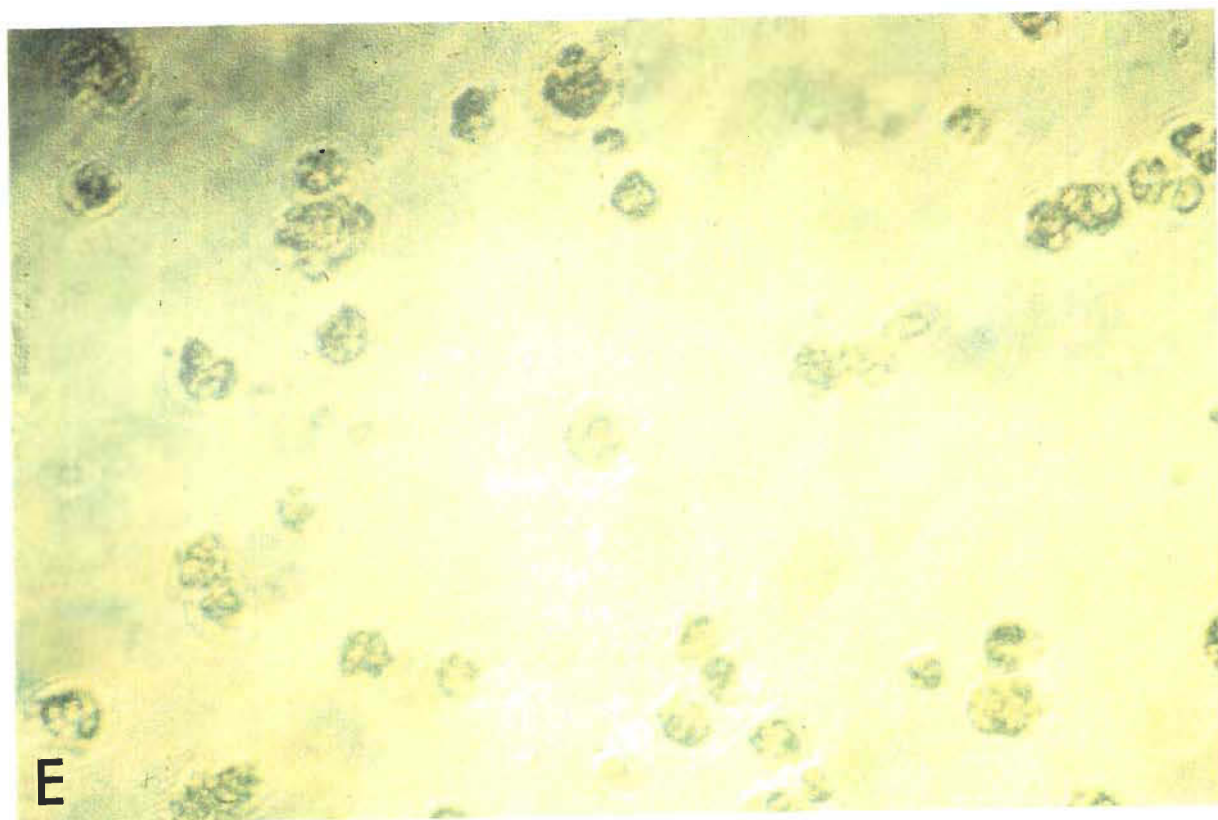
**e) Cellules de la lignée DA1 soumises à l'action des toxines solubilisées de la formulation Trident® (B.t. var. tenebrionis).**

**On note la lyse des cellules et la perte de leur morphologie typique.**









Au fur et à mesure que les cellules de culture sont de plus en plus stables, la morphologie des cellules est aussi plus constante. A ce moment, la lignée DA1 au 70<sup>ième</sup> passage présente seulement deux types de morphologie cellulaire en proportions à peu près égales. On retrouve des cellules de type épithélial et des cellules de type hémocytaire. La culture cellulaire de la lignée DA2 au 47<sup>ième</sup> passage montre deux types de morphologie cellulaire soit des cellules de type fibroblastique et des cellules de type épithélial. La culture de cellules de la lignée DL1 au 38<sup>ième</sup> passage illustre deux types de morphologie cellulaire qui sont des cellules de type hémocytaire et des cellules de type épithélial. Pour la lignée DO1 au 20<sup>ième</sup> passage, la culture de cellules présente deux types de morphologie cellulaire. On retrouve la plupart des cellules de type épithélial qui sont dans le milieu M3 et des cellules de type hémocytaire qui sont dans le milieu EX-CELL 400. C'est parce que probablement le milieu EX-CELL 400 favorise la croissance de cellules de type hémocytaire d'œufs du doryphore et le milieu M3 est efficace pour la croissance de cellules de type épithélial (Figure 7) (Tableau 4).

#### 3.3.1.2. EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

La technique de microscopie électronique a été faite en France par Docteur Charpentier lors de son année sabbatique.

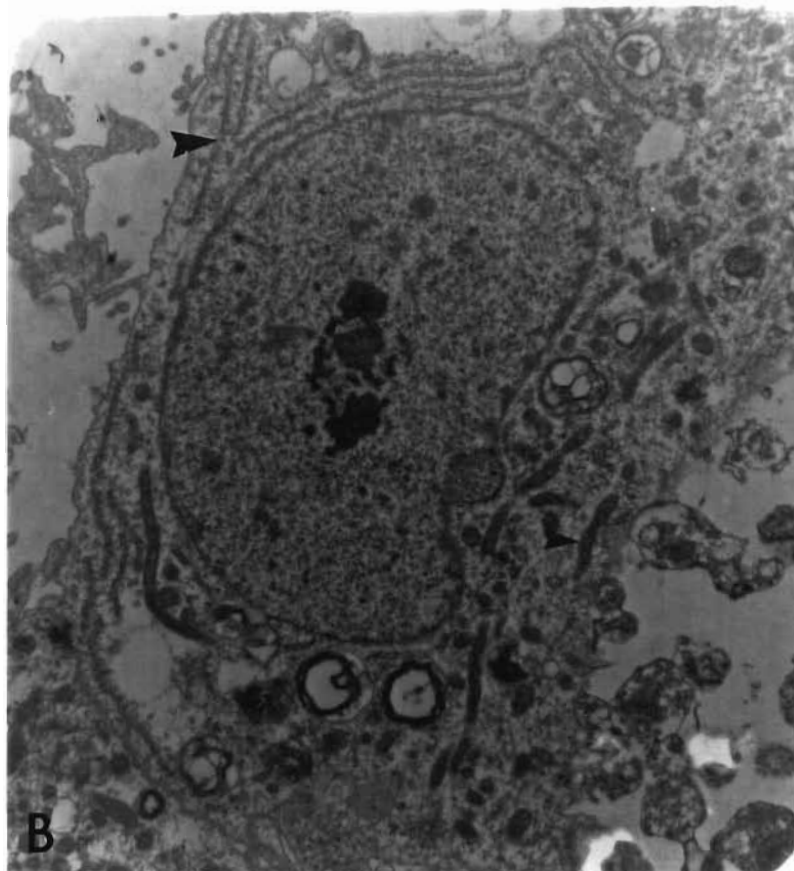
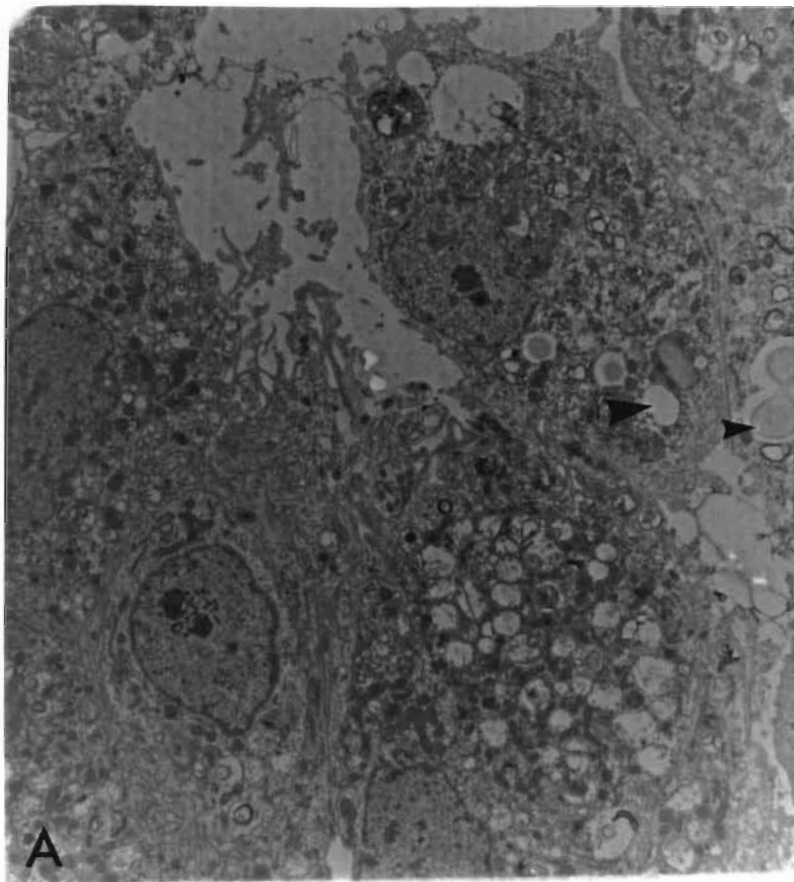
L'ultrastucture de la lignée cellulaire DA1, a été observée en microscopie

## **FIGURE 8**

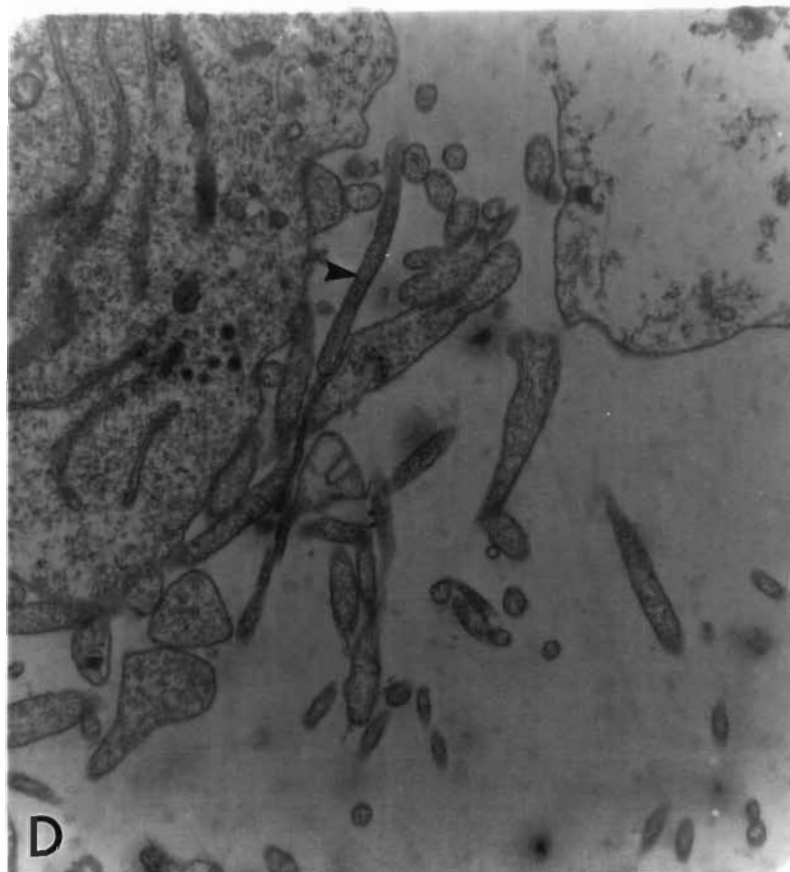
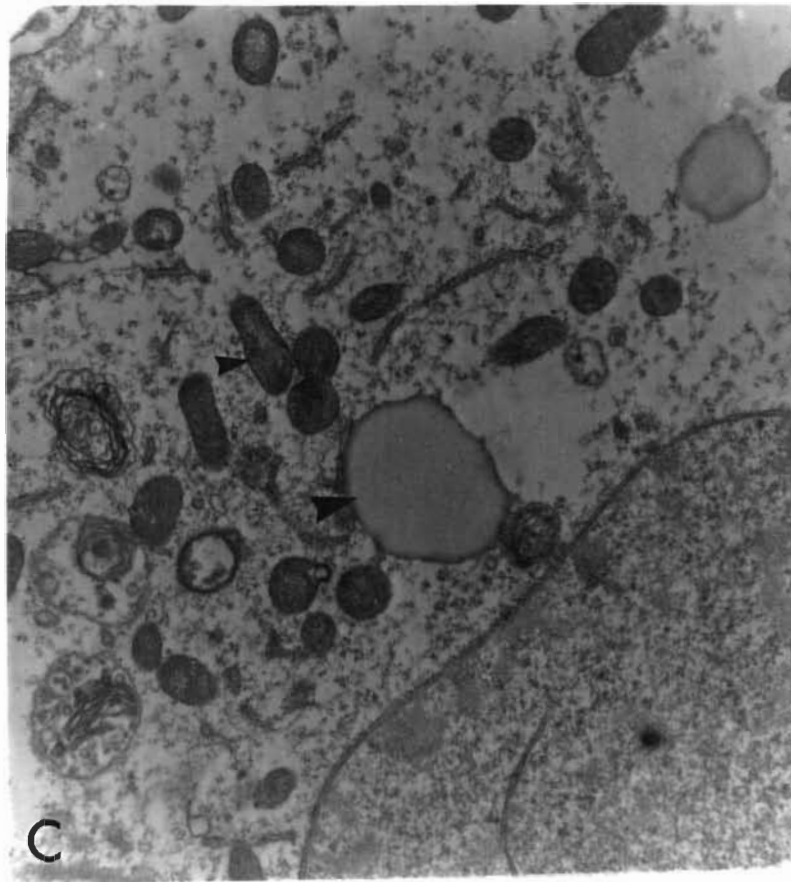
**Photographies illustrant la morphologie des cellules de la lignée DA1 en microscopie électronique.**

- a) Vue générale de la culture DA1 de cellules d'adultes de doryphore au 30ième passage. On note la présence de vacuoles(➤) et vraisemblablement, de globules de lipides ( ➤ ). (3250 x)**
- b) Grossissement montrant une cellule avec le réticulum endoplasmique (➤), des vacuoles et de nombreuses mitochondries ( ➤ ). (8190 x)**
- c) Détail d'une cellule montrant les globules vraisemblablement de lipides(➤) et des mitochondries ( ➤ ). (13000 x)**
- d) Coupe de la périphérie d'une cellule montrant de nombreuses digitations (➤). (13000 x)**









électronique (Figure: 8). On observe la présence de nombreuses vacuoles, de nombreuses mitochondries et des globules de lipides vraisemblablement d'après l'aspect en microscopie électronique (Figure: 8a et c). Il y a également de nombreuses digitations (pseudopodes) en périphérie de certaines cellules (Figure: 8d). Cela montre leur nature de phagocytes. On note finalement chez plusieurs la présence du réticulum endoplasmique (Figure: 8b) et chez certaines un appareil de Golgi.

### 3.3.2. DÉTERMINATION DU CARYOTYPE

Pour trouver les nombres des chromosomes, nous avons compté pour chaque lignée une centaine de cellules traitées par la colchicine colorées à l'orcéine (voir figure 8). Nous donnons les résultats de ces décomptes de chromosomes sur les figures 10, 11, 12, 13 (Figure 10, 11, 12, 13). Ce qui nous fournit une information initiale sur le nombre de chromosomes de chacune des 4 lignées cellulaires de doryphore.

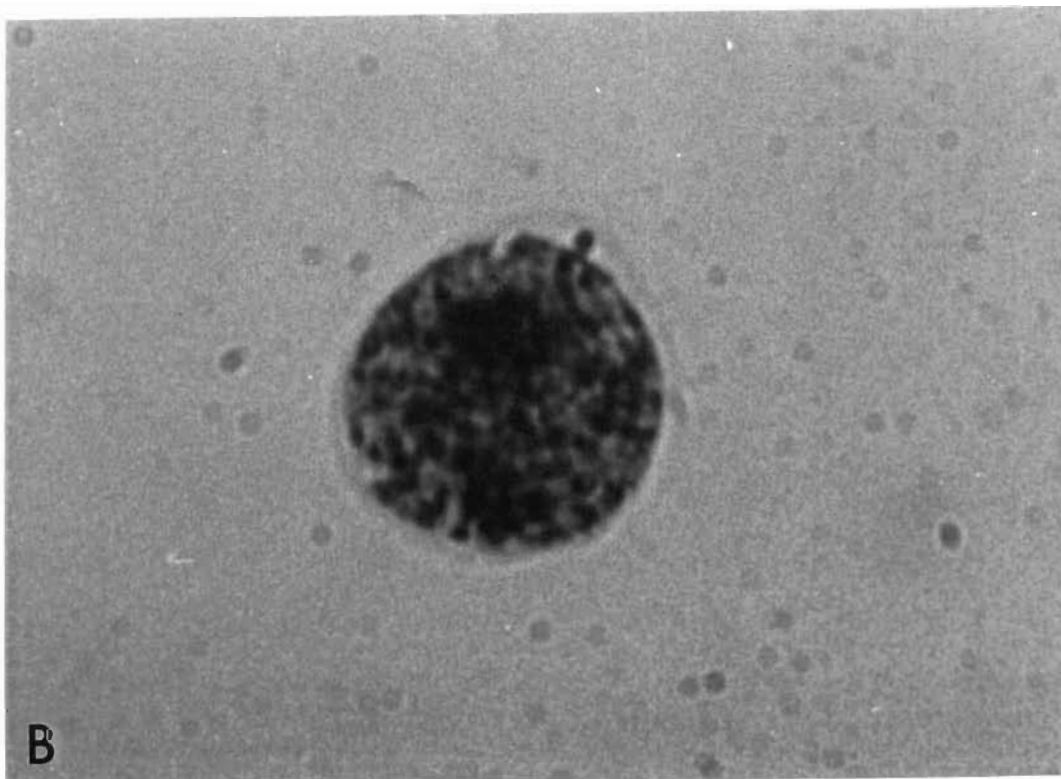
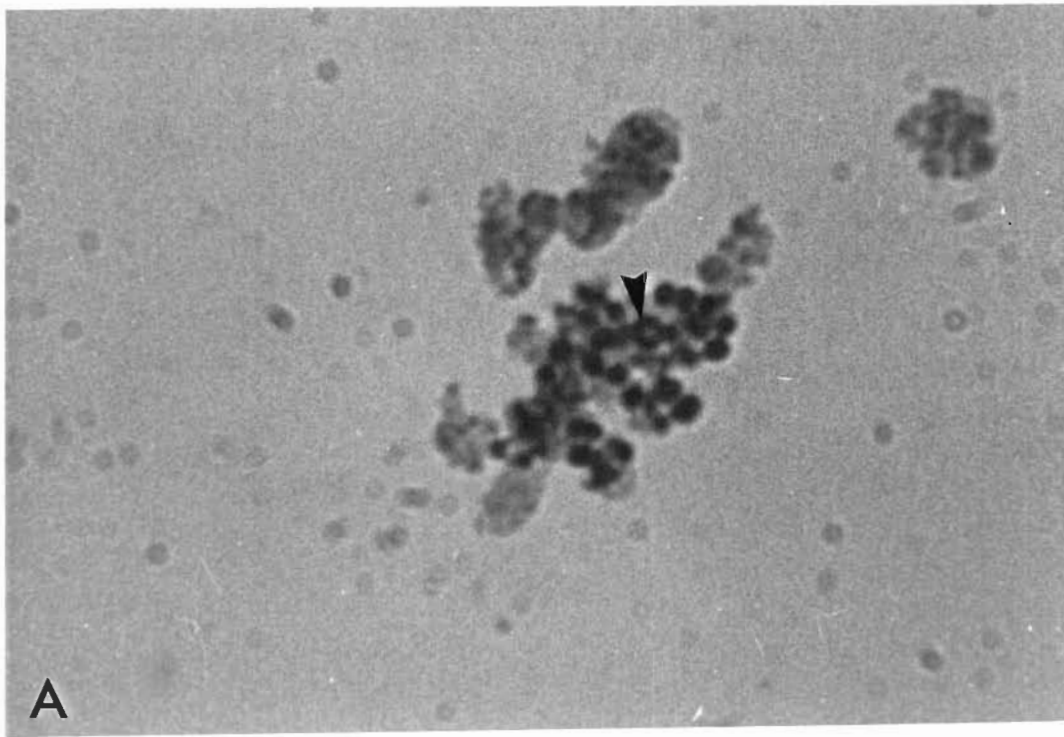
Nous avons trouvé les pourcentages de cellules de 4 types; soit haploïde, diploïde, triploïde et tétraploïde pour chaque lignée obtenue. 73% des cellules de la lignée DA1 au 62ième passage sont de type haploïde avec 17 chromosomes, 23% de type diploïde avec 35 chromosomes, 3.8% de type triploïde, 41.5% des cellules de la lignée DA2 au 41ième passage sont de type diploïde, 34% de type haploïde, 16% de type triploïde et 8.5% de type tétraploïde. 55.7% des cellules de la lignée cellulaire DL1 au 32ième passage sont de

## **FIGURE 9**

**Photographies illustrant la coloration des chromosomes des cellules de doryphore arrêtées en métaphase. Notez la présence de paires de chromosomes (►).**

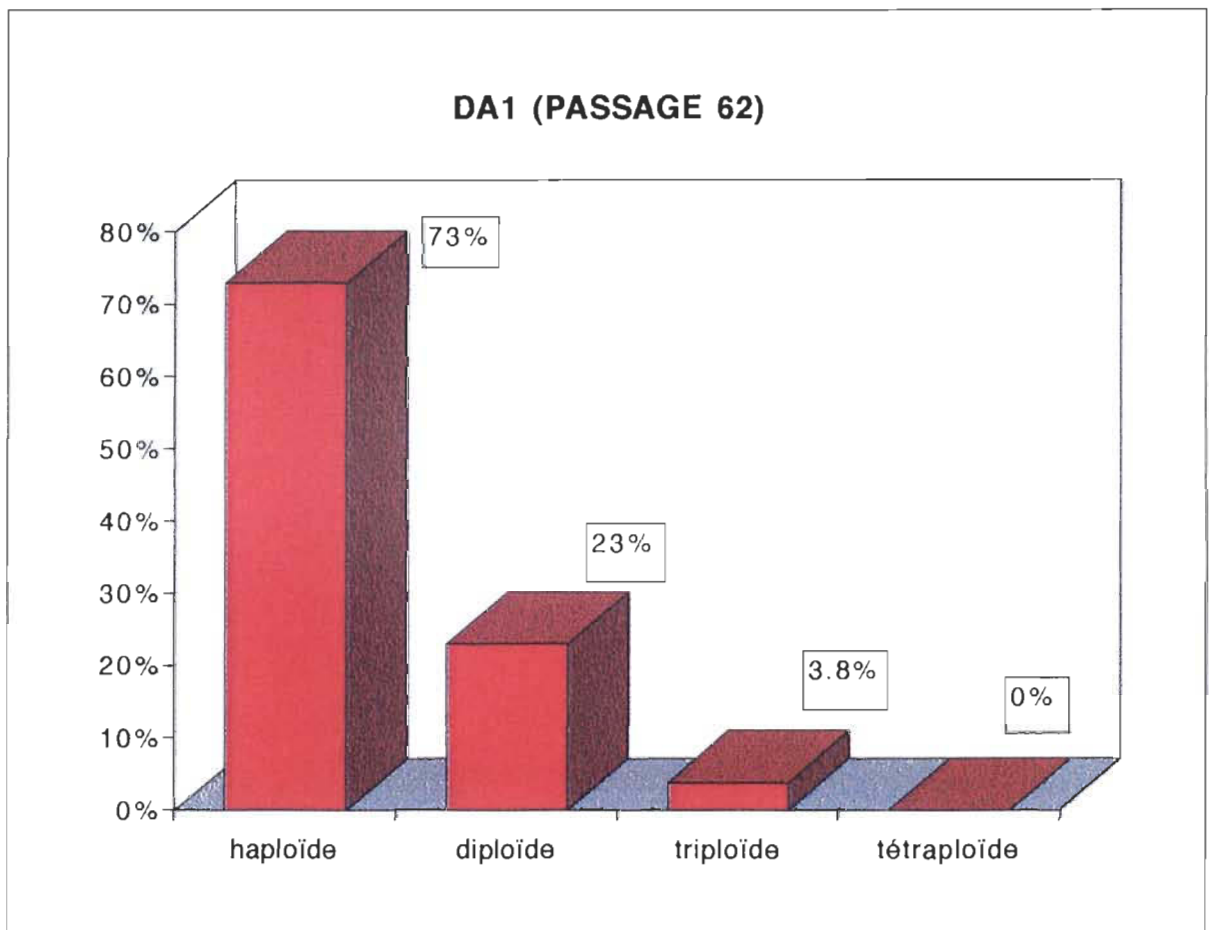
**a) (7700 x)**

**b) (8000 x)**



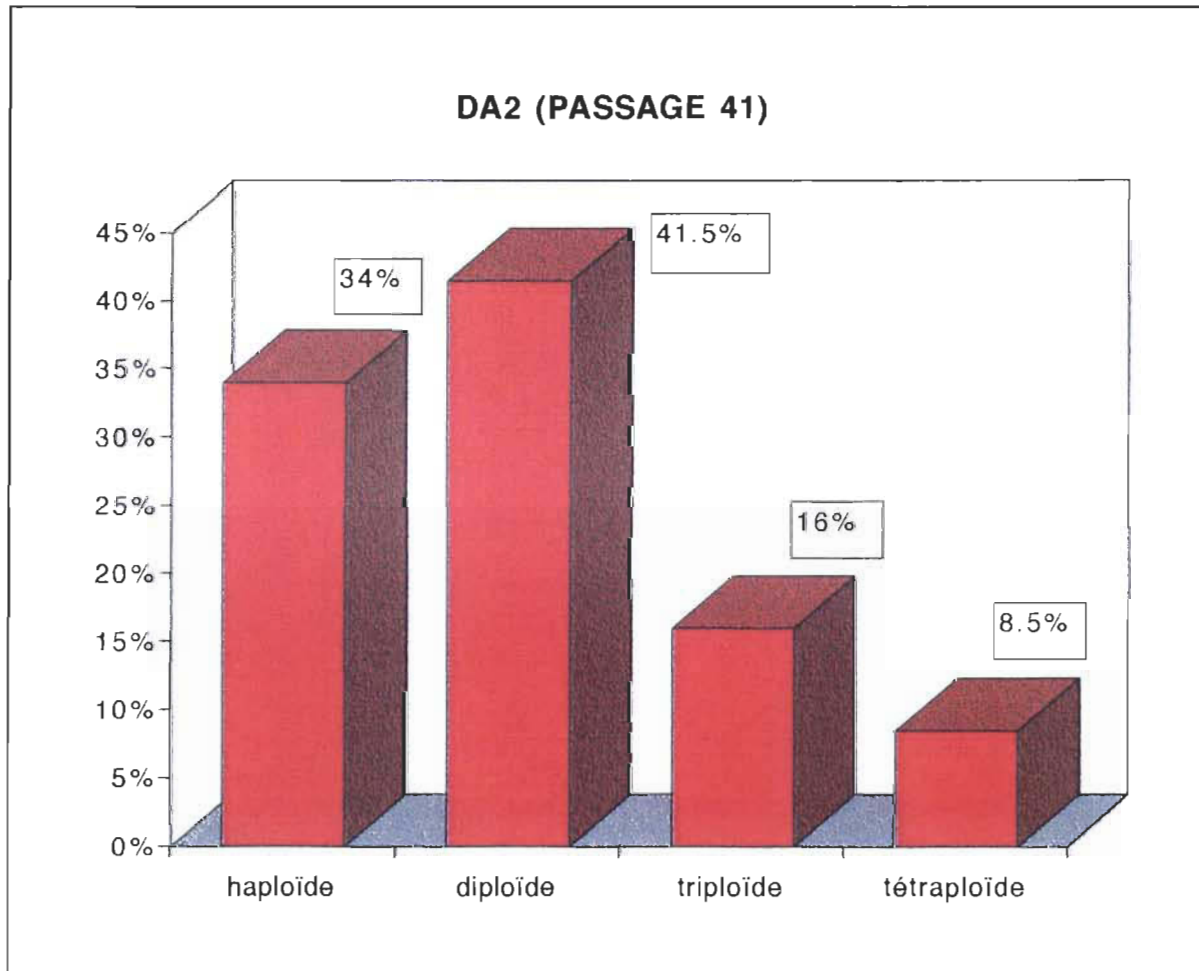
**FIGURE 10**

**LE POURCENTAGE DES CELLULES PRÉSENTANT  
n, 2n, 3n et 4n CHROMOSOMES  
DE LA LIGNÉE DA1 DU DORYPHORE**



**FIGRUE 11**

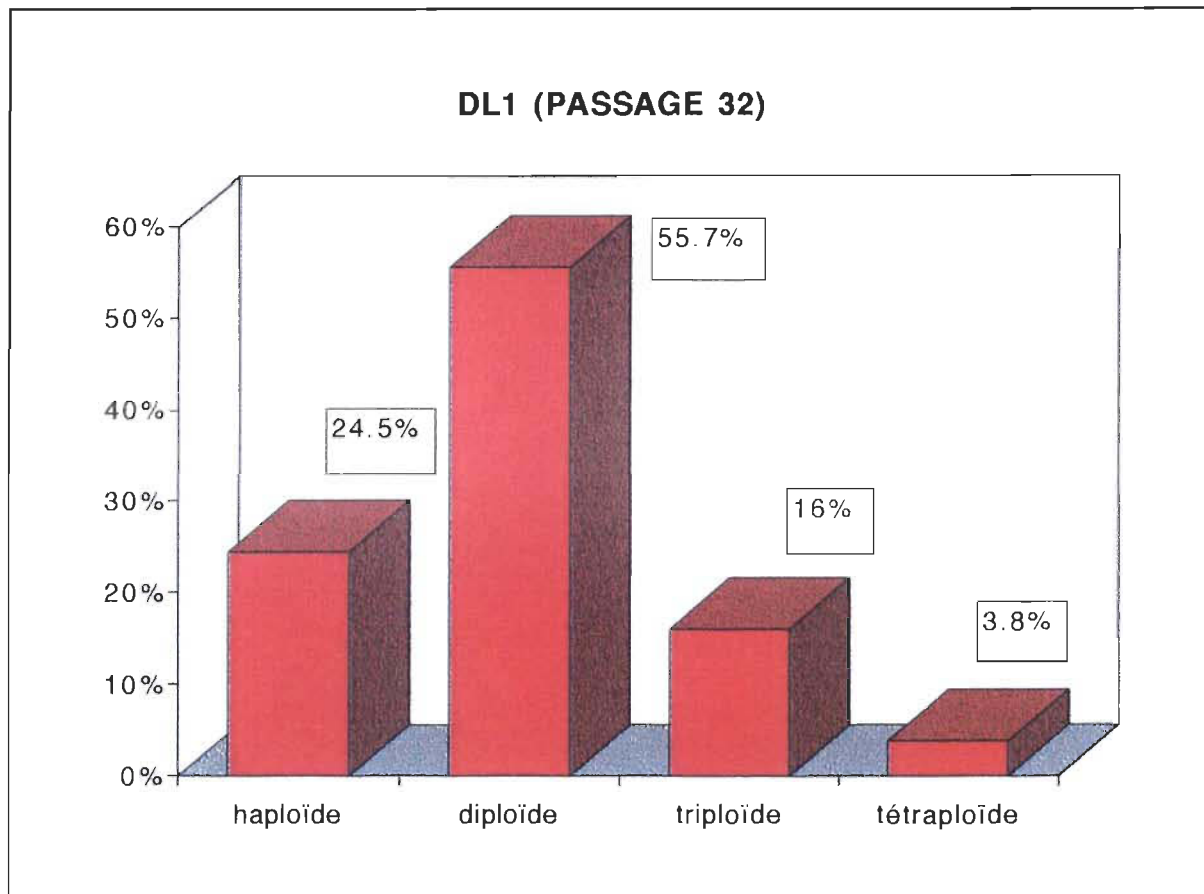
**LE POURCENTAGE DES CELLULES PRÉSENTANT  
n, 2n, 3n et 4n CHROMOSOMES  
DE LA LIGNÉE DA2 DU DORYPHORE**





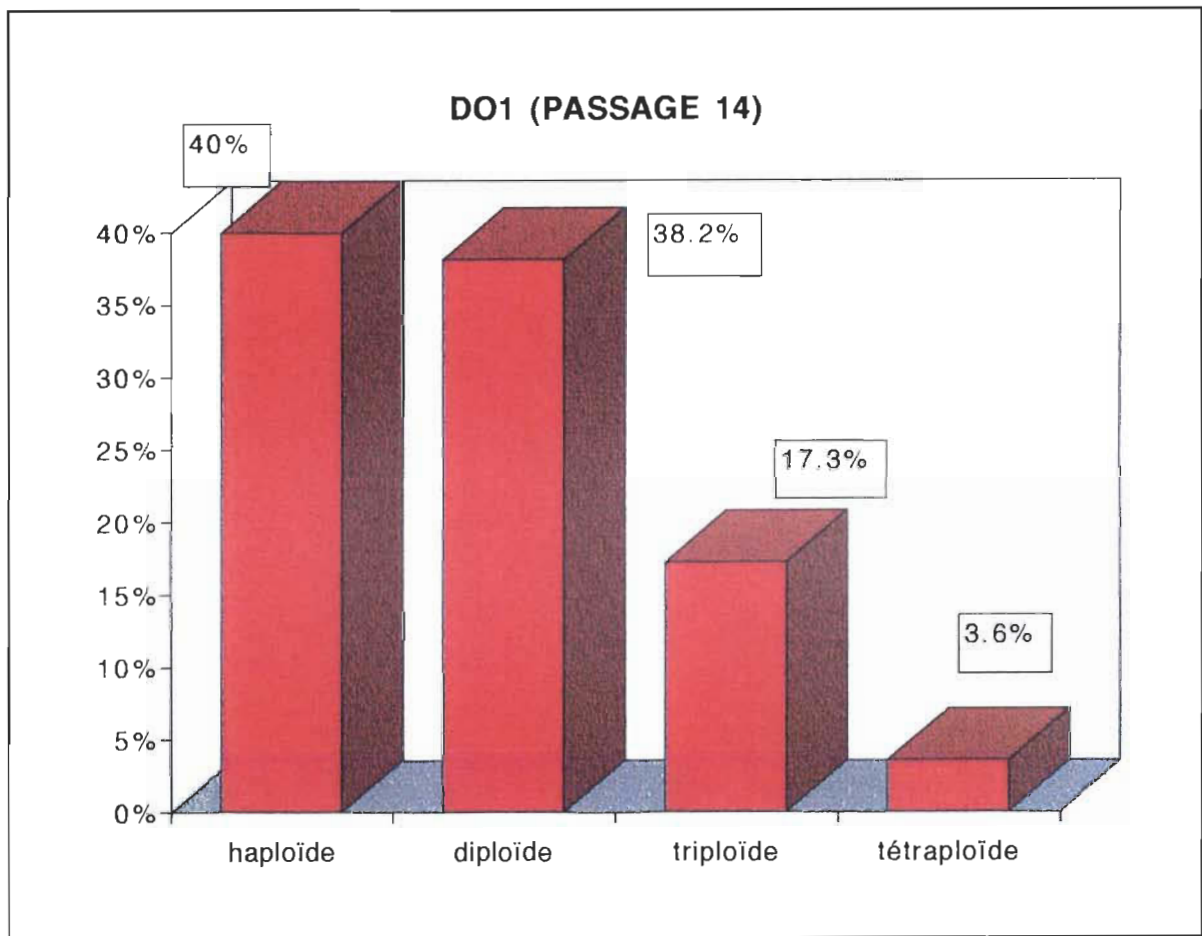
**FIGURE 12**

**LE POURCENTAGE DES CELLULES PRÉSENTANT  
n, 2n, 3n et 4n CHROMOSOMES  
DE LA LIGNÉE DL1 DU DORYPHORE**



**FIGURE 13.**

**LE POURCENTAGE DES CELLULES PRÉSENTANT  
n, 2n, 3n et 4n CHROMOSOMES  
DE LA LIGNÉE DO1 DU DORYPHORE**



type diploïde, 24.5% de type haploïde, 16% de type triploïde et 3.8% de type tétraploïde. 40% des cellules de la lignée DO1 au 14<sup>ième</sup> passage sont de type haploïde, 38.2% de type diploïde, 17.3% de type triploïde et 3.6% de type tétraploïde.

### 3.3.3. MESURE DU TEMPS DE DOUBLEMENT

Pour les temps de doublement (Annexe 4) de chaque lignée à divers passages voir le tableau 5 (Tableau: 5).

Lignée DA1, au 28<sup>ième</sup> passage a un temps de doublement du nombre de cellules d'environ 81.1 heures et au 67<sup>ième</sup> passage de 78.1 heures.

Lignée DA2, au 42<sup>ième</sup> passage a 64 heures de temps de doublement, et au 45<sup>ième</sup> passage a 47.6 heures de temps de doublement.

Lignée DL1, au 29<sup>ième</sup> passage a 31 heures de temps de doublement, et au 31<sup>ième</sup> passage a 40.2 heures de temps de doublement.

Pour la lignée DO1 qui n'est pas encore stable, on n'a pas fait de mesure de son temps de doublement.

TABLEAU 5: TEMPS DE DOUBLEMENT DE CHAQUE LIGNÉE OBTENUE

LIGNÉE	PASSAGE	TEMPS DE DOUBLEMENT (HEURES)	PASSAGE	TEMPS DE DOUBLEMENT (HEURES)
DA1	28	81,1	67	78,1
DA2	42	64	45	47,6
DL1	29	31	31	40,2

### 3.4. MISE AU POINT DE TEST DE CYTOTOXICITÉ EN CULTURE DE CELLULES DE MOUSTIQUE À L'AIDE DE MÉTHODES CYTOTOXIQUES CLASSIQUES

Dans notre laboratoire, nous avons des lignées de cellules de moustique déjà établies. Il s'agit des lignées 4, B et C d'Aedes triseriatus, et de la lignée d'Aedes aegypti. Nous avons choisi donc les cellules de moustique comme modèle pour évaluer la cytotoxicité des toxines de B.t.i.(Teknar H.P.D®.) pour la mise au point du test de cytotoxicité et par la suite appliquer le même protocole expérimental sur les lignées de cellules de doryphore.

B.t.i.(Bacillus thuringiensis var. israelensis) produit des cristaux toxiques contenant des delta-endotoxines. Ce produit s'avère fortement toxique pour les diptères et est disponible sous forme d'une solution commerciale le Teknar H.P.D®. Tous les tests de cytotoxicité en culture de cellules de moustique sont faits à l'aide de la méthode cytotoxique classique. Les résultats des techniques appliquées sont compris dans les deux parties suivantes. Nous avons ainsi obtenu la mise au point du test de cytotoxicité classique en culture de cellules de moustique.

#### 3.4.1. DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES DES SURNAGEANTS DE SOLUBILISATIONS

TABLEAU 6: RÉSULTATS DE LA CYTOTOXICITÉ DES B.T.I. ET DU BLANK  
TESTÉS SUR QUATRE LIGNÉES CELLULAIRES DE MOUSTIQUE

77

Test	B.t. (1)	(1)	B.t. (2)	(2)	B.t. (3)	(3)	Blank	Blank
lignée	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>
<u>Ae.aeg.</u>	3,6	0,05	6,24	0,05	3,92	0,06	4,48	2,0
B	3,6	0,03	6,24	0,04	3,92	0,03	4,48	1,0
C	3,6	0,014	6,24	0,04	3,92	0,03	4,48	0,92
4	2,96	0,01	4,32	0,008	3,04	0,008	2,56	1,06



Avant d'effectuer les tests de cytotoxicité sur les cultures de cellules, nous avons effectué un dosage des protéines obtenues dans le surnageant des solutions de solubilisation centrifugées (voir matériel et méthodes page 48). Nous avons comparé les densités optiques obtenues par la méthode Bio-Rad pour nos diverses solutions solubilisées à celles obtenues sur une courbe d'étalonnage à partir de solutions à diverses concentrations connues d'albumine sérique de boeuf (voir annexe 5).

On peut donc trouver la concentration de protéines de toxines du B.t.i. et de la formulation Blank en milligrammes de protéines par millilitre en reportant les valeurs de densité optique pour chaque surnageant de solubilisation de l'albumine. (voir tableau 6) (Annexe: 5) Lors des premiers tests, on a trouvé 3.6 *mg/ml* et 2.96 *mg/ml* en protéines dans les solutions solubilisées de B.t.i.; et lors des deuxièmes tests, elles sont de 6.24 *mg/ml* et 4.32 *mg/ml* pour le B.t.i.; et lors des troisièmes tests, sont de 3.92 *mg/ml* et 3.04 *mg/ml* les concentrations en protéines du Blank sont de 4.48 *mg/ml* et de 2,56 *mg/ml*.

### 3.4.2. ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ EN CULTURE CELLULAIRES DE MOUSTIQUE

Après 24 heures de contact avec les toxines solubilisées du B.t.i. et avec les protéines du Blank sur les cellules, nous avons observé de la lyse cellulaire totale ou partielle ou de l'absence de lyse selon les dilutions (Figure: 14). Les protéines de la

solution du Blank donnaient de la lyse cellulaire qu'aux dilutions 1/2 à 1/4. Après cette dernière dilution aucun effet n'était observé. Les valeurs des DTCT50 du Blank sur les diverses lignées de cellules étaient toujours de  $10^2$  fois supérieures aux valeurs de DTCT50 des toxines de B.t.i. sur les mêmes lignées. Avec les résultats du test et à l'aide de la méthode de Kärber (Annexe: 6), nous avons calculé les DTCT50 (Dose toxique en culture de tissu à 50% des cupules ou puits avec des cellules lysées pour une dilution) du B.t.i. et du Blank chaque fois. Les DTCT50 calculés sont montrées dans le tableau 6 qui donnent les résultats du test de la DTCT50 pour trois réplicats. Ainsi nous avons comparé en cytotoxicologie quatre lignées de cellules de moustique soit les lignées B, C, 4 d'Aedes triseriatus et la lignée d'Aedes aegypti et toutes ces lignées cellulaires sont sensibles pour les toxines du B.t.i..

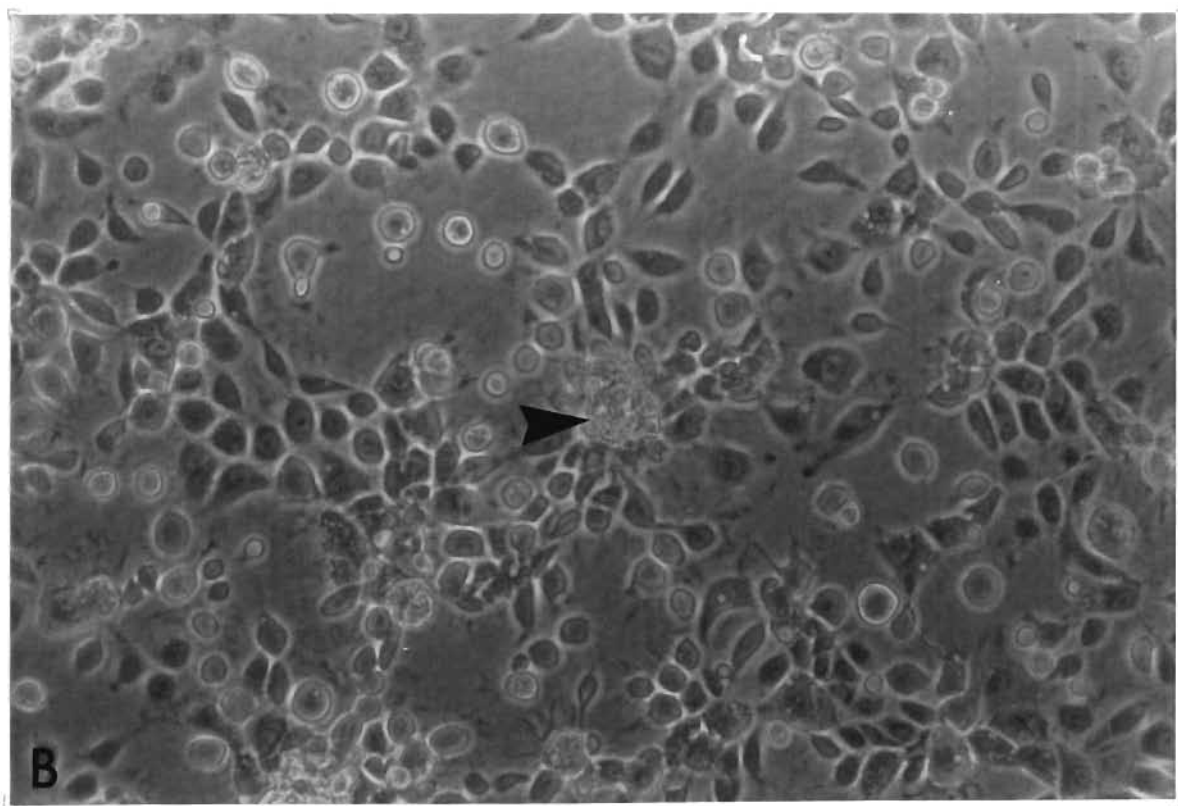
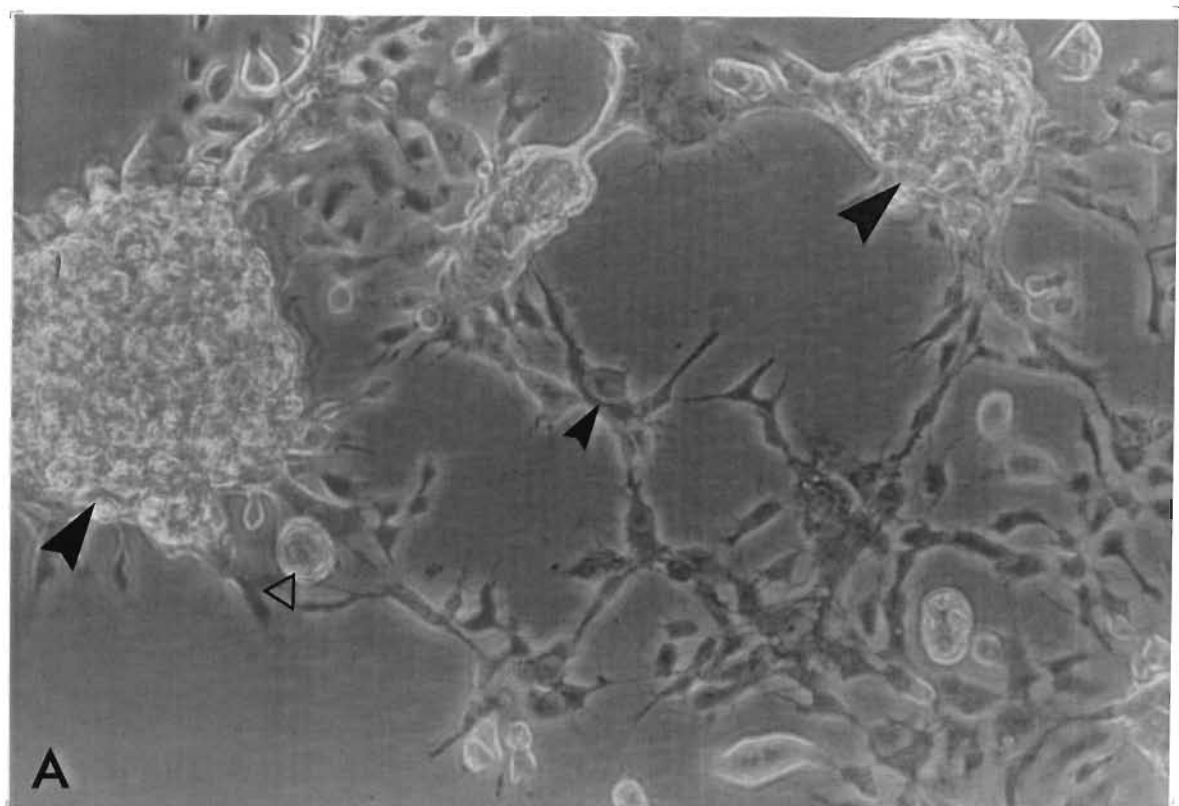
Dans le tableau 6: les lignées cellulaires de moustique qui sont sensibles pour le B.t.i. sont sensibles pour les toxines du B.t.i. dans l'ordre de sensibilité décroissante suivante; la lignée 4, la lignée C, la lignée B d'Aedes triseriatus et la lignée d'Ae. aegypti, les DTCT50 sont respectivement pour le premier essai de 0.01 ug, 0.014 ug, 0.03 ug et 0.05 ug; pour le deuxième essai les valeurs sont pour les DTCT50 de chaque lignée, pour la lignée 4 de 0.008 ug, pour la lignée C de 0.04 ug, pour la lignée B de 0.04 ug et pour la lignée d'Ae. aegypti de 0.05 ug; et pour le troisième essai, elles sont pour la lignée 4 de 0.008 ug, la lignée C de 0.03 ug, pour la lignée B de 0.03 ug et pour la lignée d'Ae. aegypti de 0.06 ug. La lignée 4 est la plus sensible et la lignée d'Ae. aegypti est la moins

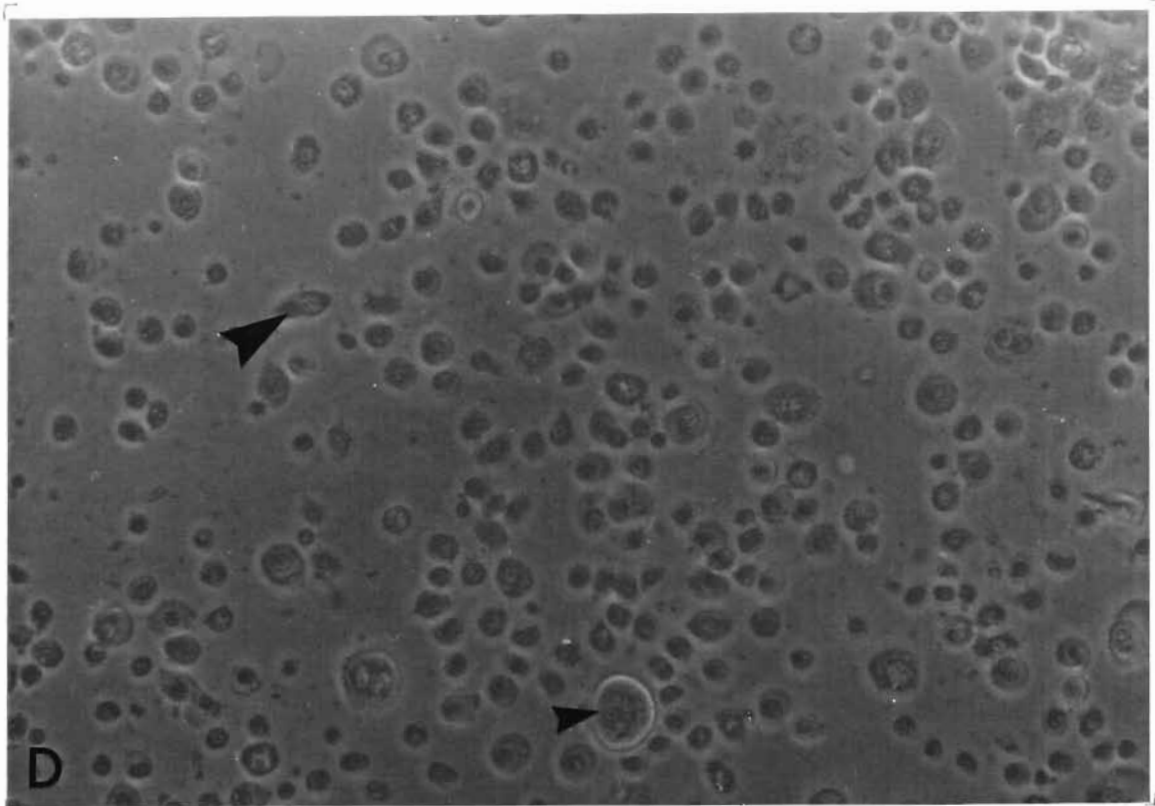
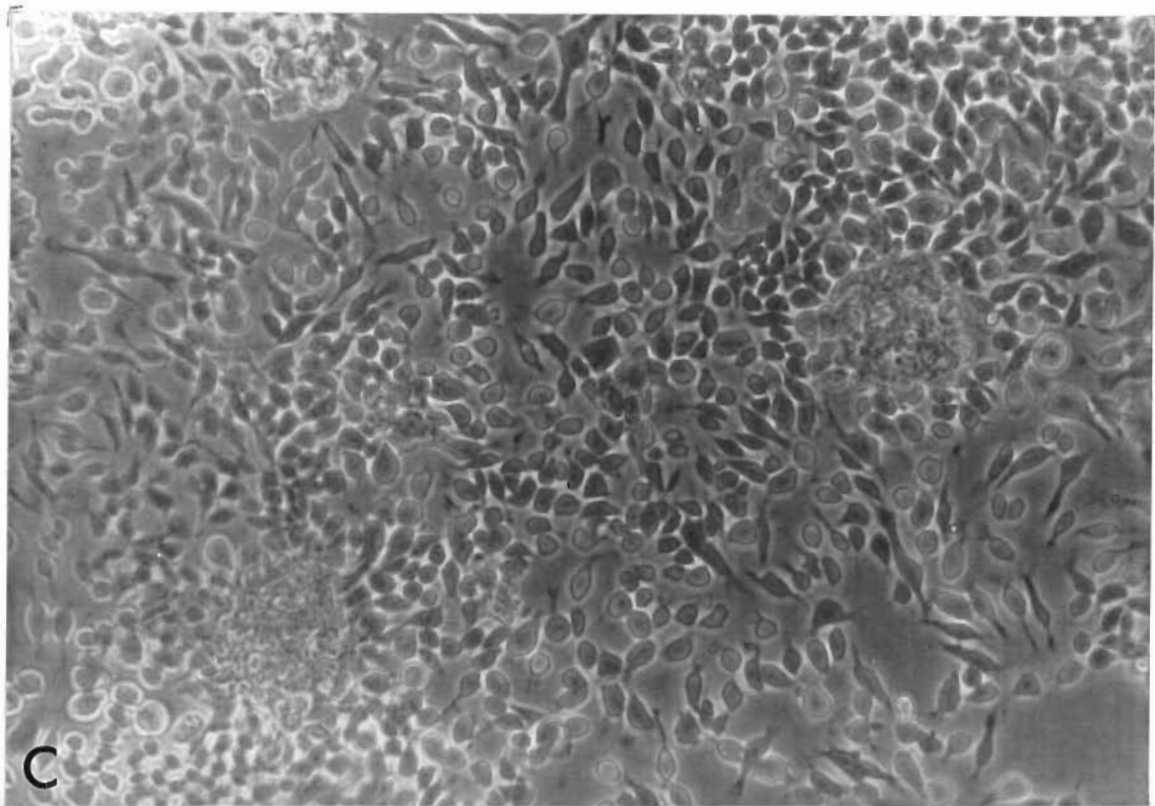
## FIGURE 14

Photographies des lignées cellulaires d'Aedes triseriatus.

- a) Lignée IV au passage 155 montrant des amas de cellules ("clumps") (►), des cellules fibroblastiques (►) et épithéliales (▷) (820 x).
- b) Lignée B au passage 122 montrant les mêmes types de cellules et de plus petits amas (►) (820 x).
- c) Lignée C au passage 153 montrant les mêmes types de cellules (820 x).
- d) Cellules de la lignée B au passage 153 après quatre heures de traitement avec les toxines du B. t. i. solubilisées à la dilution 1/500.

Notez les cellules dégénérées (►) et quelques cellules réfringentes encore vivantes (►). Toutes les cellules perdent leur morphologie fibroblastique ou épithéliale (700 x).





sensible pour le B.t.i. dans ces quatre lignées de moustique. La lignée C et la lignée B ont presque la même sensibilité pour le B.t.i.. Les expériences ont donné des effets cytotoxiques à des concentrations de 40 à 100 fois supérieures pour les toxines du B.t.i. que pour les protéines du Blank (voir tableau 6).

### 3.5. RÉSULTAT DU DOSAGE DE L'EFFET CYTOLYTIQUE DE TOXINES DE SOUCHES DE BACILLUS THURINGIENSIS SUR LES CELLULES DES LIGNÉES PERMANENTES OBÉNUES DE DORYPHORE

Avec la méthode mise au point grâce aux tests de cytotoxicité en culture de cellules de moustique, nous avons effectué des expériences sur les lignées de cellules de doryphore pour évaluer la cytotoxicité de plusieurs souches du B.t. soit la formulation Trident® (B.t.var.tenebrionis), M-one® (B.t.var.San Diego), MYX-1806® (M-one® plus), Teknar H.P.D®. (B.t. var. israelensis.), Thuricide® (B.t. var. kurstaki.) et Blank (sans toxines de Teknar H.P.D.®) (voir tableau 2).

#### 3.5.1. L'OBTENTION DE LA PROTÉINE TOXIQUE

Grâce à la méthode Bio-Rad et la courbe standard de l'albumine, la concentration en protéines toxiques de plusieurs solutions de solubilisation de diverses souches du B.t. a été trouvée par la mesure de densité optique à l'aide du spectrophotomètre et comparaison

à la courbe standard (voir annexe 5). Nous avons fait des tests de cytotoxicité avec cinq souches de B.t. (soit M-one®, Trident®, MYX-1806®, Teknar H.P.D®, Thuricide®.) et un témoin le Blank. Les résultats en concentration de protéines toxiques des diverses souches de B.t. sont donnés dans les tableaux 7, 8, 9, 10 et 11.

En ce qui concerne la concentration de protéines dans les surnageants de solubilisation des B.t. et du Blank pour le test de cytotoxicité classique sur les lignées DA1 et DL1, les tableaux 7 pour la lignée DA1, 8 pour la lignée DL1 et 9 pour la lignée DO1, indiquent une plus haute concentrations de protéines pour le MYX-1806® (19.52 à 36 *mg/ml*), et une plus basse pour le Thruricide® (2.8 à 4.16 *mg/ml*) ou le Teknar® (2.96 à 4.32 *mg/ml*). Pour le M-ONE® et le Trident®, les concentrations de protéines sont respectivement 3,16 à 5,44 *mg/ml* et 3,28 à 6,08 *mg/ml*. Et finalement, pour le Blank elles variaient de 2,4 à 6,08 *mg/ml*.

Le dosage des protéines dans les surnageants de solubilisation des B.t. et du Blank pour le test du marquage au BrdU des cellules viables sur les lignées DA1 et DL1, indiquent que les concentrations de la plus base à la plus haute sont respectivement de 2,56 à 4,24 *mg/ml* pour le Blank, de 2,8 à 3,52 *mg/ml* pour le Thuricide®, de 3,16 à 4,08 *mg/ml* pour le M-one®, 3,6 à 3,28 *mg/ml* pour le Trident®, de 3,4 à 4,24 *mg/ml* pour le Teknar® et de 19,52 à 33,6 *mg/ml* pour le MYX-1806®. Il n'y a pas beaucoup de différences entre le M-one®, Trident®, Blank, Thuricide® et Teknar® sauf pour le MYX-1806® (voir tableaux

10 et 11).

### 3.5.2. LE POTENTIEL DE CYTOTOXICITÉ SUR LES CELLULES DES LIGNÉES PERMANENTES OBTENUES

Pour évaluer le potentiel de cytotoxicité sur les cellules des lignées permanentes obtenues, nous avons utilisé la méthode cytotoxique classique et la méthode d'évaluation de viabilité cellulaire par marquage au BrdU.

#### 3.5.2.1. RÉSULTATS DE LA MÉTHODE CYTOTOXIQUE CLASSIQUE

Les tests sont effectués sur les trois lignées cellulaires soit DA1, DL1 et DO1, en triplicat et triplicat avec les cinq souches du B.t. et le Blank. Par la méthode de Kärber, nous avons pu trouver les DTCT50 des B.t. et du Blank. Les résultats finaux des DTCT50 des B.t. et Blank sur deux lignées cellulaires de doryphore sont montrés dans les tableaux 7 pour la lignée DA1, 8 pour la lignée DL1 et 9 pour la lignée DO1 qui indiquent que les DTCT50 pour la lignée DA1 du Teknar® (0,006 à 0,12 µg) sont plus faibles que pour les autres souches du B.t. et celles du MYX-1806® (0,06 à 5,63 µg) sont beaucoup plus grandes que pour les autres souches. Le Blank (1,07 à 2,7 µg) donne les plus faibles DTCT50 sur les trois lignées DA1, DL1 et DO1. Le M-one® (0,05 à 0,83 µg) et le Trident® (0,05 à 0,98 µg) ont des DTCT50 pas très différentes dans ces trois lignées. Le



TABLEAU 7: RÉSULTATS DE LA CYTOTOXICITÉ DES B.T. ET DU BLANK TESTÉS  
SUR LA LIGNÉE CELLULAIRE D'ADULTES DE DORYPHORE (DA1)

Test	1	1	2	2	3	3
B.t. et blank	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>
M-ONE	5,44	0,72	4,8	0,096	5,2	0,16
TRIDENT	6,08	0,88	4,6	0,05	5,52	0,16
MYX1806	32,64	5,63	28,8	0,06	36	2,02
TEKNAR	3,6	0,099	4,16	0,023	4,32	0,06
THURICIDE	4,16	0,93	3,04	1,35	3,3	1,47
BLANK	4,48	2,0	2,4	1,07	6,08	2,7

TABLEAU 8: RÉSULTATS DE LA CYTOTOXICITÉ DES B.T. ET DU BLANK TESTÉS  
SUR LA LIGNÉE DE LARVES DE DORYPHORE (DL1)

98

Test	1	1	2	2	3	3
B.t. et blank	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> µg	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> µg	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> µg
M-ONE	5,2	0,49	5,12	0,34	4,48	0,83
TRIDENT	5,52	0,085	3,84	0,43	4,4	0,98
MYX1806	36	0,85	22	1,47	35,6	2,8
TEKNAR	4,32	0,12	2,96	0,016	3,04	0,006
THURICIDE	3,04	0,34	3,76	1,68	3,3	0,37
BLANK	5,68	1,27	4,48	2,0	4,48	2,0

TABLEAU 9: RÉSULTATS DE LA CYTOTOXICITÉ DES TOXINES DU B.T. ET DU  
BLANK TESTÉS SUR LA LIGNÉE D'OEUF DE DORYPHORE (DO1)

B.T. et BLANK	[    ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> $\mu$ g
M-ONE	4,16	0,93
TRIDENT	3,52	0,79
MYX1806	24,48	10,9
TEKNAR	3,8	0,05
THURICIDE	4,08	1,8
BLANK	4,3	3,0

TABLEAU 10:RÉSULTATS DU TEST DE VIABILITÉ CELLULAIRE AVEC LE BRDU  
POUR ÉVALUER L'EFFET CYTOTOXIQUE DES B.T. ET DU BLANK  
SUR LA LIGNÉE CELLULAIRE D'ADULTES DE DORYPHORE (DA1)

∞

TEST	1	1	1	2	2	2
B.t. et blank	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>	DL <sub>50</sub> <i>μg/puits</i>	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>	DL <sub>50</sub> <i>μg/puits</i>
M-ONE	3,16	1,12	27,68	4,08	1,3	48,45
TRIDENT	3,6	0,57	38,25	3,28	0,65	21,5
MYX1806	33,6	9,2	252	19,52	3,8	97,6
TEKNAR	4,24	0,12	0,84	3,4	0,05	0,94
THURICIDE	3,52	-	-	2,8	0,5	17,6
BLANK	4,24	1,5	43,7	2,56	1,0	22,5

TABLEAU 11: RÉSULTATS DU TEST DE VIABILITÉ CELLULAIRE AVEC LE BRDU  
POUR ÉVALUER L'EFFET CYTOTOXIQUE DES B.T. ET DU BLANK  
SUR LA LIGNÉE CELLULAIRE DE LARVES DE DORYPHORE (DL1)

89

TEST	1	1	1	2	2	2
B.t. et blank	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>µg</i>	DL <sub>50</sub> <i>µg/puits</i>	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>µg</i>	DL <sub>50</sub> <i>µg/puits</i>
M-ONE	3,16	0,4	18,8	4,08	0,9	30,6
TRIDENT	3,6	0,25	12,4	3,28	0,2	24,6
MYX1806	33,6	1,9	52,5	19,52	1,5	67,1
TEKNAR	4,24	0,06	1,7	3,4	0,05	1,86
THURICIDE	3,52	0,39	18,7	2,8	0,5	28
BLANK	4,24	0,57	42,9	2,56	0,69	43

Thuricide® (0,34 à 1,68 µg) a une plus faible cytotoxicité que les autres souches du B.t. et est légèrement plus cytotoxique que le Blank sur les trois lignées.

### 3.5.2.2. RÉSULTATS DE LA MÉTHODE D'ESSAI PAR MARQUAGE AU BrdU DES CELLULES VIABLES

Dans le test de la méthode d'essai par marquage au BrdU de la viabilité cellulaire, nous avons tenu compte des trois aspects pour chaque expérience, soit la concentration de protéines de toxines du B.t. et du Blank, des DTCT50 et DL50 (µg/puits). Les DL50 (µg/puits) obtenues sont tirées de la méthode d'essai par marquage au BrdU des cellules viables. Alors que les DTCT50 proviennent de la lecture directe dans les plaques par la méthode d'évaluation de la cytotoxicité classique avant l'application de la méthode au BrdU. Nous avons donc trouvé par la technique au BrdU la DL50 (Dose létale 50%) des B.t. et du Blank par puits. Ces données sont montrés dans les tableaux 10 et 11 (voir Tableau 10 et 11).

Lors des deux replicats du test avec le BrdU en culture de cellules de doryphore pour évaluer la cytotoxicité des B.t. et du Blank sur les deux lignées DA1 et DL1, on a trouvé que la DTCT50 et la DL50 du Teknar® (DTCT50: 0,05 à 0,12 µg, DL50: 0,84 à 1,85 µg/puits) sont plus faibles que pour les autres souches de B.t. sur les deux lignées. Les deux lignées de cellules manifestent une plus faible toxicité avec le Blank qu'avec les

B.t.. Les cytotoxicité du MYX-1806® (DTCT50: 1,5 à 9,2 µg, DL50: 52,5 à 252 µg/puits) lors de ce test sont plus faibles que pour le M-one® (DTCT50: 0,4 à 1,3 µg, DL50: 18,8 à 48,45 µg/puits) et le Trident® (DTCT50: 0,2 à 0,65 µg, DL50: 12,4 à 38,25 µg/puits) entre les DTCT50 et les DL50 sur les deux lignées. M-one® (DTCT50: 0,4 à 1,3 µg, DL50: 18,8 à 48,45 µg/puits) et Trident® (DTCT50: 0,2 à 0,65 µg, DL50: 12,4 à 38,25 µg/puits) ont presque la même cytotoxicité (même ordre de grandeur pour les DTCT50 et les DL50) pour les deux lignées DA1 et DL1. Le Thuricide® (DTCT50: 0,39 à 0,5 µg, DL50: 17,6 à 28 µg/puits) est légèrement plus cytotoxique que le Blank (DTCT50: 0,57 à 1,5 µg, DL50: 22,5 à 43,7 µg/puits). La lignée DL1 est plus sensible pour les diverses souches du B.t. et le Blank que la lignée DA1.

Les deux méthodes pour évaluer la cytotoxicité de diverses souches du B.t. soit la méthode d'évaluation de la cytotoxicité classique et la méthode d'évaluation de la cytotoxicité par mesure de la viabilité cellulaire par marquage au BrdU, ont bien fonctionné. Nous avons pu obtenir les résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des toxines du B.t.. Surtout, nous avons pu comparer les résultats obtenus par les deux méthodes.

### 3.5.3. LA COMPARAISON DE LA CYTOTOXICITÉ DE TOXINES DE DIVERSES SOUCHES DU B.T. SUR LES CELLULES DE DA1 AVEC TRAITEMENT À LA TRYPSINE ET SANS TRAITEMENT

Pour augmenter la sensibilité de nos tests, nous avons fait la comparaison de la cytotoxicité de toxines de diverses souches du B.t. sur les cellules de DA1 avec traitement à la trypsine et sans traitement à la trypsine après la solubilisation classique. Nous avons pu évaluer les résultats obtenus et voir s'il y a changement de la cytotoxicité des toxines du B.t.. Les résultats n'ont montré aucune différence de sensibilité (pour le M-one®, avec trypsine, DTCT50 0,75 µg, sans trypsine, DTCT50 0,9 µg; pour le Trident®, DTCT50 0,36 µg et 0,56 µg; pour le Teknar®, 0,04 µg et 0,04 µg; pour le MYX-1806®, 2,56 µg et 2,53 µg; et pour le Blank, 0,89 µg et 1,03 µg) sauf pour le Thuricide® (avec trypsine: DTCT50 0,7 µg, sans trypsine: DTCT50 1,4 µg) (voir tableau 12).



TABLEAU 12: LA COMPARAISON DE LA CYTOTOXICITÉ DE TOXINES DE  
DIVERSES SOUCHES DU B.T. SUR LES CELLULES DAI AVEC  
TRAITEMENT À LA TRYPSINE ET SANS TRAITEMENT

B.T. et BLANK	AVEC TRYPSINE		SANS TRYPSINE	
	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>	[ ] <i>mg/ml</i>	DTCT <sub>50</sub> <i>μg</i>
M-ONE	4,0	0,75	4,08	0,90
TRIDENT	3,84	0,36	3,84	0,56
TEKNAR	3,34	0,04	3,14	0,04
MYX1806	27,2	2,56	26,9	2,53
THURICIDE	3,12	0,70	3,13	1,40
BLANK	3,36	0,89	3,28	1,03

## DISCUSION ET CONCLUSION

### 4.1. L'ÉTABLISSEMENT D'UN ÉLEVAGE DE DORYPHORE

Les oeufs, larves et adultes de doryphores ont été récoltés directement de champs de pommes de terre dans la région de Trois-Rivières et ramenés au laboratoire pour le démarrage d'un élevage en laboratoire. Au cours du démarrage de l'élevage de doryphores soit pour une période d'un peu près trois mois, nous avons eu une connaissance initiale pour les conditions environnementales d'élevage de doryphores en laboratoire.

Par conséquent, sous la température de 22 à 24°C, 60 à 70% d'humidité et une photopériode de 16:8 heures (jour:nuit), nous avons réussi l'élevage des quatre formes du doryphore. Le cycle de doryphore sous ces conditions a été réalisé au complet de l'oeuf à l'adulte comme en nature. De l'automne 1992 à avril 1994, nous avons obtenu 10 générations d'adultes du doryphore. Maintenant, Mlle. Louise Lambert, étudiante au laboratoire du Docteur Jean Pierre Bourassa continue ce travail et l'élevage.

### 4.2. L'OBTENTION DES QUATRE LIGNÉES CELLULAIRES DE DORYPHORE

Lors de la primo-culture de cellules, on a trouvé que les cellules à partir d'oeufs et

à partir de larves ont la capacité la plus faible de s'adapter à un nouveau milieu (milieu de culture cellulaire). Souvent après une ou deux semaines, les cellules sont lysées. Ces cultures cellulaires ont pris beaucoup de temps à démarrer.

Pour le pH du milieu, lors de démarrage des lignées cellulaires à partir de trois formes du doryphore (oeufs, larves et adultes), on a testé plusieurs milieux de culture cellulaire qui ont été préparés avec différentes proportions de sérum de veau foetal. Nous avons trouvé que le bon pH du milieu pour la culture cellulaire de doryphore, était de 7,0 pour la lignée DA1, de 6,8 pour les lignées DA2, DL1 et DO1 dans les différents milieux. Ce qui correspond à peu près aux données de Pelletier et Clark (1992) sur le pH de l'hémolymph du doryphore. De plus le pH de 6,8 utilisé par le démarrage de la lignée DO1 est le même que celui utilisé par Dübendorfer et Liebig (1992) pour le démarrage de leurs lignées à partir d'oeufs embryonnés de doryphores.

En ce qui concerne la culture de cellules à partir de trois formes de doryphore avec 5%, 10% et 20% de sérum de veau foetal comme supplément nutritif dans les milieux utilisés, nous nous sommes aperçus que cet ajout de sérum de veau foetal était nécessaire pour une meilleure croissance de nos cellules et cela même dans un milieu comme le EX-CELL 400 qui normalement devrait s'utiliser sans ajout de sérum de veau foetal. Notons que Dübendorfer et Liebig (1992) supplémentent leur milieu M3 avec 10% de sérum de veau foetal non-décomplémenté. Le sérum que nous avons utilisé n'est pas décomplémenté

non plus.

De plus, nous avons également noté que l'ajout de 1 % d'une solution de mélange de lipides dans le milieu avec 20% de sérum de veau foetal améliorerait encore plus le démarrage et la croissance des cultures de cellules de doryphore. Le milieu avec le sérum seul n'est peut-être pas suffisant pour les besoins nutritifs des cellules de ce type d'insecte. Avec 1% de la solution de mélange de lipides, au départ, on a trouvé que les cellules se sont attachées à la surface des boîtes plus vite et ont poussé plus vite que sans lipide notamment pour l'hémolymphe d'adultes du doryphore. La solution de lipides comme supplément favorise donc le démarrage et une bonne croissance des cellules. Un dernier fait vient confirmer ces observations; en effet, pour les cellules de fragments d'oeufs du doryphore démarrées dans le milieu M3 sans lipides le passage par la suite dans le milieu EX-CELL 400 à 1 % de mélange de lipides en plus du sérum de veau foetal a permis une croissance plus rapide par la suite.

Il existe un article sur la culture de cellules de doryphore à partir d'oeufs embryonnés (Dübendorfer et Liebig, 1992), ce qui nous a fourni l'information initiale pour notre travail. Toutefois, l'utilisation de l'hémolymphe de larves et d'adultes de doryphores pour démarrer des cultures de cellules est aussi un bon choix. Parce que l'usage de l'hémolymphe d'insecte a pu éviter les contaminations bactériennes comme cela aurait été le cas pour les intestins disséqués ou tout autre partie interne de l'insecte et également pour

la facilité de la manipulation et aussi pour avoir beaucoup de cellules de doryphore à cultiver. Ce qui nous a donné beaucoup de chances pour démarrer et établir des lignées cellulaires de doryphore notamment à partir de tissus de larves et d'adultes ce que n'ont pas réalisé Dübendorfer et Liebig (1992).

Le phénomène de mélanisation au départ indique qu'il y a des métabolites toxiques qui sont produits dans les primo-cultures et par des phénoloxydases. Ces métabolites peuvent inhiber la croissance des cellules si ils sont trop nombreux. Pour résoudre ce problème, nous avons fait un traitement nécessaire soit des centrifugations et des changements du milieu de culture plus fréquents. Dans les cas extrêmes nous avons perdu nos primo-cultures ou cultures lors de passages subséquents.

L'autre problème lors de la mise en culture est qu'il y a beaucoup de contaminations de cellules lors de primo-cultures et sous cultures. Pour résoudre ce problème pour la primo-culture, nous avons stérilisé les oeufs embryonnés avec une solution d'eau de Javel et une solution d'antibiotiques (6,13 *mg/ml* de penicilline et 13,5 *mg/ml* de streptomycine) pendant 1 à 3 minutes. Pour les adultes et les larves du doryphore, la décontamination de la surface de l'insecte avec d'une solution d'alcool à 70% a été effectuée. Toutes les manipulations sont faites sous la hotte stérile. Mais, encore plusieurs boîtes ou Pétris sont contaminées lors du démarrage. Par la suite lors des sous-cultures ou passages, ce problème s'estompe.

Enfin, nous avons trouvé les meilleurs milieux de culture cellulaire soit le milieu EX-CELL 400 et le milieu M3 pour les cultures de cellules du doryphore de la pomme de terre. Le milieu M3 avait été utilisé avec succès aussi par Dübendorfer et Liebig (1992) pour démarrer des lignées à partir d'œufs embryonnés de doryphore. De plus, nous avons réussi à obtenir quatre lignées cellulaires de doryphore soit DA1, DA2, DL1 et DO1.

#### 4.3. LA CARACTÉRISATION DES LIGNÉES CELLULAIRES PERMANENTES OBTENUES

Nous avons obtenu la caractérisation de la morphologie cellulaire en microscopie optique et en microscopie électronique. Les types de cellules dans les quatre lignées du doryphore ne sont pas retrouvés dans les mêmes proportions. On peut donc différencier les quatre lignées cellulaires permanentes obtenues en microscopie optique. Pour la lignée DO1, nous avons trouvé presque les mêmes types de cellules comparant avec celles de Dübendorfer et Liebig (1992).

Lors de travaux réalisés en France, le Docteur Charpentier a observé la phagocytose active de polyèdres de la polyédrie nucléaire d'Autographa californica démontrant les propriétés phagocytaires de la lignée DA1 et probablement leur origine hémocytaire en plus de la présence de digitations nombreuses à leur périphérie. Il reste à effectuer encore les travaux sur l'observation de la morphologie cellulaire en microscopie électronique des

lignées DA2, DL1 et DO1. Dübendorfer et Liebig (1992) n'ont pas observé leurs lignées au niveau ultrastructural.

Par le test de détermination des caryotypes des lignées cellulaires, nous avons obtenu une information initiale sur la ploïdie des quatre lignées cellulaires ce qui nous indique que les quatre lignées cellulaires sont différentes. La lignée DA1 est principalement haploïde, la lignée DA2 est en part presque égale diploïde et haploïde, la lignée DL1 est diploïde principalement et la lignée DO1 est en partie presque égale haploïde et diploïde. Nous avons trouvé des nombres de chromosomes ( $n=17$  et  $2n=35$ ) en accord avec la littérature concernant ceux rencontrés *L. decemlineata* (Petitpierre *et al.*, 1993).

Le temps de doublement de trois lignées cellulaires, nous fournit l'information que la lignée cellulaire à partir de larve (DL1) au trentième passage se multiplie plus vite que la lignée cellulaire à partir d'adultes DA2 au 40ième passage et que la lignée cellulaire à partir d'adultes DA1 au 30ième passage. Donc, la lignée DL1 se multiplie la plus vite. La lignée DA1 pousse la plus lentement. La lignée DO1 n'étant pas complètement établie au moment de la rédaction de ce mémoire nous n'avons pu déterminer son temps de doublement. Nos temps de doublement pour nos lignées allant d'un peu plus de 3 jours pour la lignée DA1 à moins de 2 jours pour la lignée DL1 sont plus rapides que les temps de doublement des lignées de Dübendorfer et Liebig (1992) soit 5 jours pour eux. Par contre notre lignée à partir d'oeufs embryonnés semble comme eux avoir une croissance

plus lente jusqu'à ce jour.

On remarque également une diminution des temps de doublement avec l'augmentation du nombre de passages. Par exemple: pour la lignée DA1, au début, on effectuait un passage une fois tous les 10 ou 15 jours. Au fur et à mesure du nombre de passages de cellules par exemple au 70<sup>ième</sup> passage on fait les passages à tous les 7 jours. Ce phénomène a été observé lors de l'établissement d'autres lignées de cellules d'insecte (Quiot et al., 1985).

#### 4.4. COMPARAISON DES ACTIVITÉS TOXIQUES DE DIVERSES

##### SOUCHES DU B.T.

Notre technique de solubilisation de toxines du B.t. fonctionne, on peut retrouver des protéines du B.t. dans le surnageant de solubilisation. Ce que nous démontre le dosage des protéines à l'aide de la technique Bio-Rad.

Le test de B.t.i. sur quatre lignées cellulaires du moustique indique que les lignées cellulaires d'Aedes triseriatus du moustiques sont sensibles pour B.t.i.. Dans l'ordre la sensibilité aux toxines du B.t.i. des diverses lignées sont respectivement de la plus sensible à la moins sensible la lignée 4, la lignée C, la lignée B d'Aedes triseriatus et la lignée d'Aedes aegypti.



Nos lignées d'Aedes triseriatus peuvent remplacer avantageusement la lignée de cellules d'Aedes aegypti habituellement utilisées pour l'évaluation de la toxicité de souches de B.t. "in vitro". Les effets cytotoxiques observés en microscopie optique sur nos lignées d'Aedes triseriatus correspondent à ceux déjà décrits dans la littérature notamment sur cellules du moustiques Aedes albopictus (Thomas et Ellar, 1983).

Les résultats du test de cytotoxicité sur les lignées DA1 et DL1 nous montrent que le "Blank" est de 2.2 à 17 fois, moins toxique et constitue notre témoin. Car le "Blank" comprend tous les ingrédients de la formulation de B.t.i. soit du Teknar H.P.D®. sauf les ingrédients actifs qui contiennent les cristaux toxiques, les spores et les débris bactériens.

MYX1806® est peu toxique comparé aux autres souches car les toxines présentes dans cette formulation sont produites par la bactérie Pseudomonas manipulée génétiquement. En effet, on a cloné le gène de la toxine du B.t. dans cette bactérie et après la croissance de la bactérie et la production des protéines toxiques dans celle-ci, on fixe la cellule bactérienne. Donc, les cristaux de toxines sont dissous difficilement dans ces conditions d'encapsulation de la bactérie, cette encapsulation protégeant la toxine dans l'environnement. L'insecte peut par la suite manger la bactérie fixée et libérer ainsi la toxine encapsulée.

Le Thuricide® est légèrement plus toxique que les "Blank" et moins toxique que

M-one® et Trident®. C'est normal puisque c'est une souche toxique pour lépidoptères.

Au cours d'application de diverses souches du B.t. commercial et du "Blank®" dans les test "in vitro", les deux méthodes montrent que le Teknar® a une toxicité plus grande pour les deux lignées DA1 et DL1 que le M-one® et le Trident®, de 2 à 21 fois. C'est sans doute causé par la toxine CytA qui agit même sur les cellules de mammifères. CytA est seulement présente dans cette souche parmi nos préparations avec les toxines (Porter, et al., 1993).

A part le Teknar®, le M-one® et le Trident® sont les deux B.t. qui fonctionnent le mieux. C'est normal puisqu'elles sont spécifiques au doryphore.

La comparaison des tests sur la lignée DA1 et sur la lignée DL1 a montré que la lignée DL1 est plus sensible pour les B.t. que la lignée DA1. Les ligées B,C et 4 d'Aedes triseriatus sont plus sensibles pour le B.t.i. que les deux lignées DA1 et DL1 du doryphore. Ce qui est normal puisque le B.t.i. est une souche spécifique "in vivo" pour les diptères.

Le test de la comparaison de toxicité avec trypsine et sans trypsine après la solubilisation, nous donne des résultats montrant aucune différence entre les DTCT50 sans ou avec traitement. Donc, la trypsine pour ces souches n'ajoute rien à la toxicité. Par contre, il y a une légère augmentation de la toxicité par le traitement à la trypsine dans le

cas du Thuricide®. Il se pourrait donc que nous puissions augmenter la cytotoxicité de nos souches en ajoutant un traitement avec les enzymes digestifs du doryphore, comme cela a été fait pour d'autres souches (Dai et Gill, 1993).

La comparaison des deux méthodes pour évaluer la cytotoxicité de diverses souches du B.t. soit la méthode d'essai de cytotoxicité classique et la méthode d'essai de cytotoxicité par mesure de la viabilité cellulaire par marquage au BrdU, nous montre que la technique cytotoxique classique semble suffisante et simple pour évaluer la toxicité du B.t. par rapport à la technique au BrdU plus complexe. En fait, nous avons obtenu les mêmes résultats par les deux techniques. D'ailleurs Chow et Gill (1989) avec une technique de mesure de viabilité au MTT avait trouvé des LC50 comparables à la technique d'évaluation de la cytotoxicité par coloration au bleu de trypan.

Nous possédons donc une technique simple de titration et d'évaluation du potentiel toxique de diverses souches de Bacillus thuringiensis "in vitro" sur cultures de cellules de doryphore qui peut servir de substitut aux tests "in vivo" chez l'insecte. Notre méthode d'évaluation classique de la cytotoxicité se compare tant au point de vue de la sensibilité et de la simplicité aux tests "in vitro" déjà décrits dans la littérature en ce qui concerne le B.t. notamment celle au MTT (Chow et Gill, 1989) et celle à base du phénomène d'hémolyse de globules rouges de diverses espèces animales causé par certaines toxines de certaines souches de B.t.. D'ailleurs cette dernière technique de dosage de toxines de B.t.

par leur activité hémolytique ne fonctionne qu'avec certaines souches (Sandler et al., 1985; Thomas et Ellar, 1983). De plus, les chercheurs du laboratoire du Docteur Jacques Boisvert à l'U.Q.T.R. ont noté des variations selon de type de globules rouges (groupes sanguins, espèces animales etc...) avec cette technique lors du dosage des toxines du B.t.i. (Docteur Boisvert, communication personnelle).

Il se peut qu'un traitement avec les enzymes digestifs du doryphore puisse augmenter la sensibilité et la spécificité de notre technique pour les souches de B.t. spécifiques pour le doryphore "in vivo". Cependant, il se peut comme le souligne (Slaney et al. 1992) que ce traitement n'ajoute rien à la cytotoxicité de certaines souches comme le traitement à trypsine dans notre cas qui n'augmente que la cytotoxicité du B.t.k. Slaney et al. (1992) suggèrent que les facteurs limitant dans certains cas seraient le manque de forte affinité du domaine de fixation à la cellule des protéines du crystal pour les récepteurs cellulaires spécifiques ou l'habilité plus ou moins grande du domaine toxique à modifier la perméabilité membranaire. Il faudra tester l'action des protéases digestives du doryphore sur les toxines des B.t. pour le savoir.

Dès maintenant, nous pouvons envisager diverses utilisations de nos quatre lignées de doryphore dans le futur:

- 1). Elles peuvent permettre d'évaluer le potentiel de diverses souches de B.t. ("screening")

vis-à-vis le doryphore, n'éliminant pas la nécessité en bout de ligne de tests "in vivo" chez l'insecte.

2). Elles peuvent permettre de doser les toxines de diverses souches de B.t. dans l'environnement. #1. sur le feuillage de plants de pomme de terre; #2. dans le sol au pied des plants après un épandage.

3). Elles peuvent permettre d'évaluer la persistance des toxines dans l'environnement: sol, eau de ruissellement, etc....

4). Elles peuvent permettre d'étudier le mode d'action des toxines et leur spécificité en culture de cellules, notamment à l'aide de toxines purifiées.

5). Elles peuvent permettre d'étudier d'autres pathogènes, virus et notamment des toxines de champignons avec lesquelles les chercheurs du laboratoire du Docteur Charpentier travaillent.

6). Aussi elles peuvent permettre d'étudier la physiologie, l'histochimie, etc...<sup>des</sup> cellules de doryphore, comme cela a débuté avec les travaux de Dübendorfer et Liebig (1992).

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adang, M. J., M. S. Brody, G. Cardineau, N. Eagan, R. T. Roush, C.K. Shewmaker, A. Jones, J. V. Oakes et K. E. McBride, 1993. The reconstruction and expression of a Bacillus thuringiensis cryIIIA gene in protoplasts and potato plants. *Plant Molecular Biology*, 21: 1131-1145.
- Andrews, R. E., K. Kanda et L. A. Bulla, Jr., 1982. In vitro translation of the entomocidal toxin of B. thuringiensis. Dans "Molecular Cloning and Gene Regulation in Bacilli", (eds:) A.T. Ganesan, S. Chang et J.A. Hoch, Academic Press, Inc. New York, p:121-130.
- Angsuthanasombat, C., N. Crickmore et D. J. Ellar, 1991. Cytotoxicity of a cloned Bacillus thuringiensis subsp. israelensis CryIVB toxin to an Aedes aegypti cell line. *FEMS Microbiology Letters*, 83: 273-276.
- ANONYME., Bio-Rad Laboratories, 1979. Bio-Rad Protein Assay. Bio-Rad Laboratories, Richmond (California, USA), 1-17.
- Argauer, R. J., G. E. Cantwell et W. W. Cantelo, 1991. Evidence for a novel insecticide active exotoxin produced by the HD116 strain of Bacillus thuringiensis var. morrisoni. *J. Entomol. Sci.* 26:205-213.
- Aronson, A. I., 1993. The two faces of Bacillus thuringiensis: insecticidal proteins and post-exponential survival. *Molecular Microbiology*, 7: 489-496.
- Arpaia, S. et B. Ricchiuto, 1993. Effects of Bacillus thuringiensis toxin extracts on feeding behavior and development of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae., *Environ. Entomol.*, 22: 334-338.

- Bagan, C., A. Fedorko et K. Kmitowa, 1982. Factors responsible for effectiveness of microbial control of number of plants as exemplified by Colorado beetle (Leptinotarsa decemlineata Say). Pol. Ecol. Stud., 8:363-407.
- Barton, K. A. et M. J. Miller, 1993. Production of Bacillus thuringiensis insecticidal proteins in plants. Transgenic Plants, Academic Press, Inc. New York, 1: 297-315.
- Beirne, B. P., 1971. Pests insect of annual crops in Canada, I lepidopera, II diptera, III coleoptera. Entom. Soc. Canada Mem., p:123.
- Belloncik, S., H. Rocheleau et M. Arella, 1989. Replication of a cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) in cultured insect cells. dans l'article "Invertebrate Cell System Applications", J. Mitsuhashi [Ed], CRC Press Boca Raton, U.S.A., 2: 31-42.
- Bernhard, K., 1986. Studies on the delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis var. tenebrionis FEMS Microbial. Lett., 33: 261-265.
- Bhattacharya, P. R., 1993. Bacillus thuringiensis crystal protein ( $\delta$ -endotoxin) gene expression is independent of early sporulation specific functions. J. Biosci., 18: 221-228.
- Biever, K. D. et R. L. Chauvin, 1992. Suppression of the Colorado potato beetle (Coleoptera:Chrysomelidae) with augmentative releases of predaceous stinkbugs (Hemiptera: Pentatomidae). J. Econ. Entomol. 85.
- Bonnemaison, L., 1962. Les ennemis animaux des plantes cultivées et des forêts. Partie II: 94-100, Editions Sep. Paris.
- Bulla, L. A. jr., et A. A. Yousten, 1979. Bacterial insecticides. Microbial Biomass,



- Economic Microbiology, 4: 91-113.
- Butler, M., 1988. Processes with animal cell and tissue cultures. Biotechnology "special microbial processes", (ed:) H. -J. Rehm, New York: VCH, 6B: 249-316.
- Burgerjon, A. et G. Biache, 1966. Alimentation au laboratoire de Perillus bioculatus Fabr. avec des larves de Lepinotarsa decemlineata Say intoxiquées par la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis Berliner. Entomophaga, II: 279-284.
- Cantwell, G. E. et W. W. Cantelo, 1981. Bacillus thuringiensis, a potential control agent for the Colorado potato beetle. Am. Potato J., 58: 457-468.
- Cantwell, G. E., E. Dougherty et W. W. Cantelo, 1983. Activity of the beta-exotoxin of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis against the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) and bacterial mutagenic response as determined by the Ames test. Environ. Entomol., 12: 1424-1427.
- Cantwell, G. E. et W. W. Cantelo, 1984. Control of the Colorado potato beetle with Bacillus thuringiensis variety thuringiensis. Am. Potato J., 61: 451-458.
- Cappaert, D. L., F. A. Drummond et P. A. Logan, 1991. Incidence of natural enemies of the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata [Coleoptera: Chrysomelidae] on a native host in Mexico. Entomophaga, 36: 369-378.
- Casagrande, R. A., 1987. The colorado potato beetle: 125 years of mismanagement. Bull. Entomol. Soc. Am., 33: 142-150.
- Chin, C. -T., 1950. Studies on the physiological relations between the larvae of

- Leptinotarsa decemlineata Say and some solanaceous plants. Tijdschr. Plzieckt., 56: 1-88.
- Chow, E. et S. S. Gill, 1989. A rapid colorimetric assay to evaluate the effects of Bacillus thuringiensis toxins on cultured insect cells. J. of Tissue Culture Methods, 12: 39-42.
- Cidaria, D., A. Cappai, A. Vallesi, V. Caprioli et G. Pirali, 1991. A novel strain of Bacillus thuringiensis (NCIMB 40152) active against coleopteran insects. FEMS Microbiology letters, 81: 129-134.
- CPVQ (Conseil les productions végétales du Québec), 1991. Pomme de terre "protection", AGDEX 161/605, Publication: 02-9106, Gouvernement du Québec, Québec, P:33-38.
- Dai, S. -M. et S. S. Gill, 1993. In vitro and in vivo proteolysis of the Bacillus thuringiensis subsp. israelensis CryIVD protein by Culex quinquefasciatus larval midgut proteases. Insect Biochem. Molec. Biol., 23: 273-283.
- De Oliveira, D. D., 1992. La lutte biologique contre le doryphore de la pomme de terre. Chapitre 9, 205-219, dans «La Lutte Biologique», (eds:) C. Vincent et D. Coderre, Gaëtan Morin éditeur, Boucherville (Canada).
- Duchênes, R. -M. et G. Boiteau. 1987. Microbial control of insects pest of potato. dans "potato pest management in Canada /lutte contre les parasites de la pomme de terre au Canada", 112-132, (eds:) G. Boileau, R. P. Singh et R. H. Parry, Proc. Symp. "Improving potato pest protection" Entente Canada /N. B. sur le developpement du

- secteur agro-alimentaire, Frédérickton, N. B., p:354.
- Duchêne, R.-M., 1990. Utilisation du Bacillus thuringiensis contre le doryphore de la pomme de terre au Québec. *Phytoprotection*, 71: 141.
- Ducros, G., J.-M. Quiot, S. Belloncik et G. Charpentier, 1992. Etablissement de nouvelles lignées cellulaires de diptères piqueurs. *Mém. Soc. r. belge. Entomol.*, 35: 125-128.
- Dübendorfer, A. et B. Liebig. 1992. Cell differentiation in vitro and establishment of permanent, ecdysone-responsive cell lines from embryonic tissues of the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata. *J. Insect Physiol*, 38: 397-407.
- Dutky, S. R., 1940. Two new spore forming bacteria causing milky diseases of japanese beetle larvae. *Journal of agricultural research*, 61:57
- Ferro, D. N. et W. D. Gelernter, 1989. Toxicity of a new strain of Bacillus thuringiensis to Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, 82: 750-755.
- Follett, P. A., F. Gould et G. G. Kennedy, 1993. Comparative fitness of three strains of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in the field: Spatial and temporal variation in insecticide selection. *J. Econ. Entomol.*, 86: 1324-1333.
- Forgash, A. J., 1985. Insecticide resistance in the Colorado potato beetle, dans D.N.Ferro et R.H. Voss (eds:). "Procedings of the symposium on the Colorado potato beetle". XVII. International Congress of Entomology, Mass. Agr. Exp. Stn. Res. Bull. N. 704: 33-53.

- French II, N. M., D. C. Heim et G. G. Kennedy, 1992. Insecticide resistance patterns among Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), populations in North Carolina. Pestic. Sci., 36: 95-100.
- Gauthier, N. L., R. N. Hofmaster et M. Semel, 1981. History of Colorado potato beetle control. Dans J. H. Lashomb et R.A. Casagrande (eds), "Advances in potato pest management". Hutchinson Ross, Stroudsburg, Penn. (USA), 13-33.
- Gill, S. S., E. A. Cowles et P. V. Pietrantonio, 1992. The mode of action of Bacillus thuringiensis endotoxins. Annu. Rev. Entomol., 37: 615-636.
- Giroux, S., J. -C. Côté, C. Vincent, P. Martel et D. Coderre. 1994. Bacteriological insecticide M-One effects on predation efficiency and mortality of adult Coleomegilla maculata lengi (Coleoptera: Coccinellidae). J. Econ. Entomol., 87: 39-43.
- Goh, K. S., W. M. Tingey, R. L. Gibson, M. Semel, T. Clarke, D. Moyer, G. MacNeil, D. Young, J. Kubecka et R. Lemarie, 1988. Insecticide resistance in New York populations of the Colorado potato beetle, 1986 & 1987. Dans "Insecticide & acaricide tests" 13: 142-143, Entomological society of America, Lanham, Md. (USA).
- Grace, T. D. C., 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. Nature (London), 195: 788-789.
- Grace, T. D. C., 1982. Development of insect cell culture. Dans «Invertebrate cell

- culture applications» K. Maramorosch et J. Mitsuhashi (eds:), Academic Press, New York, U.S.A., p: 1-7.
- Gringorten, J. L., D. P. Witt, R. E. Milne, P. G. Fast, S. S. Sohi et K. Van. Frankenhuyzen. 1990. An in vitro system for testing Bacillus thuringiensis toxins: The lawn assay. J. Invertebr. Pathol., 56: 237-242.
- Hamel, G., 1990. La lutte au doryphore continue. Le bulletin des agricultures, Juin., 30-31.
- Hamel, G., 1991. Le doryphore résiste encore. Le bulletin des agricultures, Oct., 38-40.
- Harris, C. R. et S. J. Svec, 1981. Colorado potato beetle resistance to carbofuran and several other insecticides in Québec. J. Econ. Entomol. 74: 421-424.
- Heim, D. C., G. G. Kennedy et J. W. Van Duyn, 1990. Survey of insecticide resistance among North Carolina Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) populations. J. Econ. Entomol., 83: 1229-1235.
- Himeno, M., N. Koyama, T. Funato et T. Komano, 1985. Mechanism of action of Bacillus thuringiensis insecticidal delta-endotoxin on insect cells in vitro. Agric. Biol. Chem., 49: 1461-1468.
- Hsiao, C. et T. H. Hsiao, 1982. Inheritance of three autosomal mutations in the Colorado potato beetle Leptinotarsa decemlineata (Coleoptera: Chrysomelidae). Can. J. Genet. Cytol., 24: 681-686.
- Hoffmaster, R. N., 1979. The Colorado potato beetle problem. Vegetable Growers News,

33: 2-3.

- Hough-Goldstein, J. et C. B. Keil, 1991. Prospects for integrated control of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) using Perillus bioculatus (Hemiptera: Pentatomidae) and various pesticides. J. Econ. Entomol., 84: 1645-1651.
- Hsiao, T. H. et C. Hsiao, 1983. Chromosomal analysis of *Leptinotarsa* and *Labidomera* species (Coleoptera: Chrysomelidae). Genetica, 60: 139-150.
- Ingle, S. S., K. K. Rao et H. S. Chhatpar, 1993. In vitro assay for testing the toxicity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis delta endotoxin using blood agarose plates. J. Appl. Bacteriol., 74: 645-648.
- Ioannidis, P. M., E. Grafius et M. E. Whalon, 1991. Patterns of insecticide resistance to azinphosmethyl, carbofuran and permethrin in the colorado patato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol., 84: 1417-1423.
- Johnson, D. E., 1981. Toxicity of Bacillus thuringiensis entomocidal protein toward cultured insect tissue. J. Invertebr. Pathol., 38: 94-101.
- Johnson, D. E., 1984. Selection for resistance to Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin in an insect cell line (Choristoneura fumiferana). Experientia, 40: 274-275.
- Johnson, D. E., 1987. Incidence of insect cell cytolytic activity among Bacillus thuringiensis serotypes. FEMS Microbiology Lett., 43: 121-125.
- Johnson, T. B., A. C. Slaney, W. P. Donovan et M. J. Rupar, 1993. Insecticidal activity of EG4961, a novel strain of Bacillus thuringiensis toxic to larvae and adults of southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) and Colorado patato

- beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol., 86: 330-333.
- Kamionek, M., H. Sandner et H. Seryczynska, 1974. Combined action of *Paecilomyces farinosus* Dicks (Fungi imp. : Moniliales) and *Neoaplectana carpocapsae* Weiser, 1955 (Nematoda: Steinernematidae) on certain insects (*Galleria mellonella*, *Tribolium castaneum*, *Trogoderma granarium*). Acta Parasit, Pol., 22:357-363.
- Kamionek, M., H. Sandner et H. Seryczynska, 1974. The combined action of *Beauveria bassiana* (Bals./Vuill.) (Fungi imperfecti: Moniliales) and *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Nematoda: Steinernematidae). [Galleria mellonella, Tribolium castaneum, biological control]. Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol., 22: 253-257.
- Knight, H. H., 1923. Studies on the life history and biology of *Perillus bioculatus* Fabricius, including observations on the nature of the color pattern. State Entomol. Minn. Rep. 19:50-96.
- Knight, H. H., 1952. Review of the genus *Perillus* with description of a new species (*Hemiptera*, *pentatomidae*). Ann. Entomol. Soc. Am. 45: 229-232.
- Knowles, B. H., J. G. Carroll, J. M. Horsnell et D. J. Ellar, 1989. Interaction of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with liposomes and membranes. Zentralbl Bakteriell Suppl, 19: 207-208.
- Knowles, B. H. et D. J. Ellar, 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. Biochimica et Biophysica Acta, 924: 509-518.
- Krasnoff, S. B., S. Gupta, R. J. St. Leger, J. A. A. Renwick et D. W. Roberts, 1991.

- Antifungal and insecticidal properties of the efraeptins: Metabolites of the fungus Tolypocladium niveum. J. Invertebr. Pathol., 58: 180-188.
- Krieg, A., A. M. Huger, C. A. Langenbruch et W. Schnetter, 1983. Bacillus thuringiensis var. tenebrionis new variety, a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. Z. Ang. Entomol. 96: 500-508.
- Krieg, A., W. Schnetter, A. M. Huger et G. A. Langenbruch. 1987. Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis, strain BI 256-82: a third pathotype within the H-serotype 8a8b. System. Appl. Microbiol., 9: 138-141.
- Kruse, JR. P. F. et M. K. Patterson, JR., 1973. Chapter 5. Sample Preparations of media. Dans «Tissue culture---methods and application» New York: Academic Press, 27: 868.
- Lam, A. B. et J. M. Webster. 1972. Effecft of the DD-136 nematode and of a  $\beta$ -exotoxin preparation of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis on leatherjackets, Tipula paludosa larvae. J. Invertebr. Path., 20: 141-149.
- Lipa, J. J., 1968. Nosema leptinotarsae sp. n., a microsporidian parasite of the Colorado patato beetle, Leptinotarsa decemlineata (Say). J. Invertebr. Pathol., 10: 111-115.
- Lynn, D. E., 1989. Methods for the development of cell lines from insects. J. of tissue culture methods, 12: 23-29.
- Masson, L., G. Préfontaine, L. Péloquin, P. C. K. Lau et R. Brousseau, 1989. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki isolates NRD-12 and HD-1.



- Biochem. J., 269: 507-512.
- McCarthy, W. J., J. N. Aronson et J. Labenberg, 1988. 63A KDa toxic polypeptide from Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (HD-263): Effects on several lepidopteran cell lines. In *Vitro Cellular & Developmental Biology*, 24: 59-64.
- McClanahan, R. J. et J. Founk, 1981. The comparative effect of some granular insecticides on foliar potato insects and yields. P.99, Dans "Pesticide Research Report: Expert Committee on Pesticide Use in Agriculture", Ottawa, Ontario.
- McIntosh, A. H., C. M. Ignoffo et P. L. Andrews, 1985. In vitro host range of five baculoviruses in lepidopteran cell lines. *Intervirology*, 23: 150-156.
- Mckinley, R. G., 1988. Insect pest control on potatoes. *Outlook on agriculture*, 17: 30-34.
- Mettus A.-M. et A. Macaluso, 1990. Expression of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin genes during vegetative growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1128-1134.
- Mitsuhashi, J. et K. Maramorosch, 1964. Leafhopper tissue culture: embryonic, nymphal and imaginal tissues from aseptic insects. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 22: 435.
- Murphy, D. W., S. S. Sohi et P. G. Fast, 1976, Bacillus thuringiensis enzyme-digested deltaendotoxin: Effect on cultured insect cells. *Science*, 194: 954-956.
- Paul, J., 1970. Chapter 21. Virology and host-parasite relationships, dans «Cell and tissue culture» éditeurs du livre E. & S. Livingstone, Edinburgh and London, p385-408.

- Payment, P. et M. Trudel, 1989. Isolement et identification des virus. Dans «Manuel de techniques virologiques», P. Payment et M. Trudel (éditeurs), Presses de l'université du Québec/AUPELF, Sillery, Canada, p: 21-44.
- Pelletier, Y. et C. L. Clark, 1992. The haemolymph plasma composition of adults, pupae, and larvae of the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata (Say), and development of physiological saline solutions. The Canadian Entomologist, 124: 945-949.
- Perlak, F. J., T. B. Stone, Y. M. Muskopf, L. J. Petersen, G. B. Parker, S. A. McPherson, J. Wyman, S. Love, G. Reed, D. Biever et D. A. Fischhoff, 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. Plant Molecular Biology, 22: 313-321.
- Petitpierre, E., C. Segarra et C. Juan. 1993. Genome size and chromosomal evolution in leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). Hereditas, 119: 1-6.
- Porter, A. G., E. W. Davidson et J. -W. Liu, 1993. Mosquitocidal toxins of Bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. Microbiological Reviews, 57: 838-861.
- Pucci, C., 1992. Biological control of potato beetle, Leptinotarsa decemlineata Say (Coleoptera: Chrysomelidae) in northern latium, central Italy. J. Appl. Ent., 113: 194-201.
- Quiot, J.-M., S. Paradis et C. Louis. 1985. Establishment of a cell line (SPC G1 13) from dorsal vessels of Gromphadorhina laevigata, Saussure and Zentner

- (Dictyoptera: Blattidae). In vitro cellular & Developmental Biology. 21: 603-605.
- Radcliffe, E. B., 1982. Insect pest of potato. Annu. Rev. Entomol. 17: 173-204.
- Reed, L. J. et H. Muench, 1938. A simple method of estimating fifty percent end-points. Amer. J. Hyg., 27: 493-497.
- Reynolds, E. S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17: 208-212.
- Rhodes, R. A., 1965. Symposium on microbial insecticides, II. Milky disease of the japanese beetle. Bacteriological Reviews, 29: 373-380.
- Roush, R. T., C. W. Hoy, D. N. Ferro et W. M. Tingey, 1990. Insecticide resistance in the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): Influence of crop rotation and insecticide use. J. Econ. Entomol., 83: 315-319.
- Rupar, M. J., W. P. Donovan, R. G. Groat, A. C. Slaney, J. W. Mattison, T. B. Johnson, J. -F. Charles, V. C. Dumanoir et H. de Barjac, 1991. Two novel strains of Bacillus thuringiensis toxic to coleopterans. Appl. Environ. Microbiol., 57: 3337-3344.
- Sandler, N., R. Iomper, A. Keynan et J. Margalit. 1985. Bacillus thuringiensis var. israelensis crystal hemolysis as a possible basis for an assay of larval toxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol, 23: 47-53.
- Sauriol, P., 1991. La lutte mécanique contre les insectes ... ça marche! Le bulletin des agricultures., Avril, 35-37.
- Schmidt, N. C. J. et G. W. Kirfman, 1992. NovoBtt - A novel Bacillus thuringiensis ssp.

- tenebrionis for superior control of Colorado potato beetle, and other leaf-feeding Chrysomelidae. Brighton Crop Protection Conference "Pests and Diseases", 4C-7, p: 381-386.
- Schmutterer, H., 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, Azadirachta indica. Annu. Rev. Entomol., 35: 271-297.
- Schneider, I., 1973. Kariology of cells in culture F. Characteristics of insect cells. Dans Kruse, P.E.J., Patterson, M.K., Jr., (eds:), "Tissue culture methods and applications", Academic Press, New York, U.S.A., p: 788-790.
- Sears, M. K., 1987. Significance of parasitoids in control of insects pests of potatoes, p: 193-200, dans G.Boiteau, R.P. Singh et R.H.Parry, (eds:), "Potato pest management in Canada---lutte contre les parasites de la pomme de terre au Canada". Fredericton, Nouveau-Brunswick.
- Singh, K. R. P., 1967. Cell culture derived from larvae of Aedes albopictus (Skuse) and Aedes aegypti (L.). Curr. Sci. 36: 506-508.
- Slaney, A. C., H. L. Robbins et L. English. 1992. Mode of action of Bacillus thuringiensis toxin CryIIIa: An analysis of toxicity in Leptinotarsa decemlineata (Say) and Diabrotica undecimpunctata howardi Barber. Insect Biochem. Molec. Biol., 22: 9-18.
- Stanuszek, S., 1970. Pathogenicity of nematodes of the genus Hexameris (Steinerm, 1934) in relation to the female colorado beetle (Leptinotarsa decemlineata Say). Zesz. Probl. Postep. Nauk. Roln., 92:359-367.

- St. Julian , G. et L. A. Bulla, JR., 1973. In "Current topics in comparative pathobiology"  
T. G. Cheng, (ed.), Academic Press, New York and London, P: 57.
- Tamaki, G. et B. A. Butt, 1978. Impact of Perillus bioculatus on the colorado potato beetle and plant damage. U.S. Dep. Agric. Tech. Bull. p: 1581.
- Thomas, W. E. et D. J. Ellar, 1983. Bacillus thuringiensis var. israelensis crystal delta-endotoxin: effect on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. J. Cell. Sci. 60: 181-197.
- Tisler, A. M. et G. W. Zehnder, 1990. Insecticide resistance in the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on the eastern shore of Virginia.  
J. Econ. Entomol., 83: 666-671.
- Trouvelot, B., 1939. Les phénomènes de résistance naturelle des plantes aux attaques des insectes et essai de leur utilisation pour la lutte contre le doryphore. 7e Int. Cong. Ent., Berlin, p: 2726-2730.
- Trouvelot, B., J. Dixmeras, P. Grison et H. Lacotte, 1937. Remarques sur les rapports biologiques entre le doryphore et diverses variétés de pomme de terre. Rev. Path. Vég. Ent. Agric., 24: 32-39.
- Trouvelot, B. et P. Grisson, 1935. Variations de fécondité du Leptinotarsa decemlineata avec les Solanum tubérifères consommées par l'insecte. C. R. Ac. Sci., 201: 1053-1055.
- Vaughn, J. L., 1973. Chapter 5. Sample preparations of media. Dans «Tissue culture methods and application» Paul F. Kruse, JR. et M. K. Patterson, JR. (eds:).

- Whalon, M. E., D. L. Miller, R. M. Hollingworth, E. J. Grafuis et J. R. Miller, 1993. Selection of a Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) strain resistant to Bacillus thuringiensis. J. Econ. Entomol., 86: 226-233.
- Whitaker, A. et A. M. Whitaker, 1972. Chapter 6. Application of cell culture to virology. dans "Laboratory Monographs «Tissue and cell culture»" Wellcome Foundation, Baltimore, p: 10-21.
- Wyatt, G.R. et S.S. Wyatt, 1976. The development of an insect tissue culture medium. Dans «Invertebrate tissue culture», (eds.) Kurstak, E., et K. Maramorosch, Academic Press, New York, p: 249-255.
- Yoshida, K. -I., Y. Fujita, E. Mukai, K. Sen, M. Himeno, H. Sakai, et T. Komano, 1993. Importance of the central region of 130-kDa insecticidal proteins of Bacillus thuringiensis var. israelensis for their activity in Vivo and in Vitro. Biosci. Biotech. Biochem., 57: 584-590.
- Zehnder, G. W. et W. D. Gelernter, 1989. Activity of the M-ONE formulation of a new strain of Bacillus thuringiensis against the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) relationship between susceptibility and insect life stage. J. Econ. Entomol., 82: 756-761.
- Zehnder, G. W., G. M. Ghidui et J. Speese III, 1992. Use of the occurrence of peak Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) egg hatch for timing of Bacillus thuringiensis spray applications in potatoes. J. Econ. Entomol., 85: 281-288.

## **ANNEXES**

## ANNEXE 1:

### La préparation du colorant à l'orcéine

2 grammes d'orcéine sont dissouts dans 45 *ml* de la solution d'acide acétique à 70% bouillante en agitant continuellement. Quand la solution est refroidie à 50°C, on ajoute 55 *ml* d'eau distillée. La solution est refroidie à la température du laboratoire et est filtrée.

Note: La solution du colorant d'orcéine doit être filtrée au moment de l'emploi pour éliminer les précipités.



## ANNEXE 2:

### La préparation du colorant au violet cristal (0,1 %)

0,1 *gramme* de violet de cristal dans 100 *ml* d'une solution d'acide citrique 0,1 M  
(19,2 *grammes* d'acide citrique par litre d'eau distillée).

Note: Ce colorant n'agit que sur les cellules vivantes,  
ces dernières prennent une couleur violacée.

### ANNEXE 3:

#### La méthode de dénombrement de cellules viables avec l'hématimètre

Les cellules considérées vivantes (cellules entièrement colorées) sont mises à la surface d'une grille d'hémacytomètre en diluant avec la solution de colorant pour le décompte des cellules viables. On décompte seulement les cellules qui sont à la surface interne d'un carré de la grille. Le décompte est effectué dans quatre carrés. Le nombre total de cellules calculées est divisé par 4 afin d'avoir le nombre de cellules par carré d'hémacytomètre.

La formule de calcul:

$$\underline{\text{Nbr. de cellules /ml} = M \times \text{facteur de dilution} \times V}$$

$$M = N/4 \text{ (N = nombre total de cellules dans} \\ \text{4 carrés)}$$

$$\text{Facteur de dilution} = \text{facteur de dilution avec} \\ \text{la solution de colorant}$$

$$V = \text{volume d'un grand carré fait } 1/10000 \text{ de ml}$$

Exemple:

0,2 *ml* de suspension de cellules dilué avec 0,2 *ml* de la solution de colorant de violet cristal, on décompte le nombre de cellules dans les 4 carrés est respectivement 42, 41, 44, 40. Donc, le nombre de cellules par le millilitre est suivant:

$$\begin{aligned}\text{Nbr. de cellules/ml} &= N/4 \times 2 \times 1/1/10000 \\ &= 42 + 41 + 44 + 40 / 4 \times 20000 \\ &= 41,75 \times 20000 \\ &= 835000\end{aligned}$$

#### ANNEXE 4:

### Le calcul du temps de doublement

La formule est suivante:

$$1/\text{Temps de doublement} = \frac{\log_{10} N_2 / N_0}{t^2 - t^1} - \frac{\log_{10} N_1 / N_0}{t^1 - t^0}$$

$N_2$  = valeur ou nombre de cellules par millilitre au temps 2.

$N_1$  = valeur ou nombre de cellules par millilitre au temps 1.

$N_0$  = nombre de cellules par millilitre au temps de départ.

$t^2$  = temps de  $N_2$  décompté.

$t^1$  = temps de  $N_1$  décompté.

Note: Premier temps 24 heures (dans la courbe que l'on a dessiné, on choisierais comme temps zéro.), alors, le deuxième temps choisit serait 72 heures avant la phase de plateau ou d'arrêt de croissance. On choisit toujours deux temps dans la partie droite de la courbe. log du nombre de cellules en fonction du temps.

Exemple:

nombre de cellules par fois:

$$N_0 = 35000 \quad N_1 = 24800$$

$$N_2 = 62400 \quad N_3 = 67200$$

$$N_4 = 104800$$

$$\frac{1}{\text{Temps de doublement}} = \frac{\frac{\log_{10} N_2 / N_0}{\log_{10} 2} - \frac{\log_{10} N_1 / N_0}{\log_{10} 2}}{96 \text{ heures} - 48 \text{ heures}}$$

$$\frac{1}{\text{Temps de doublement}} = \frac{\frac{\log_{10} N_2 / N_1}{\log_{10} 2}}{96 - 48}$$

$$= \frac{\log_{10} 104800 / 62400}{\log_{10} 2} / 48$$

$$\text{Temps de doublement} = 64 \text{ (heures)}$$

## ANNEXE 5:

### Le calcul du dosage de protéines de surnageant de solubilisation des toxines du B.t.

La protéine de l'albumine est considérée un témoin pour faire la courbe de standard.

On a fait des dilutions avec la solution mère dont la concentration est  $200 \mu\text{g/ml}$   
d'albumine avec l'eau distillée diminéralisée.

facteur de dilution	concentration de protéines(log)
1/10	$1,40 \mu\text{g/ml}$
1/15	$1,22 \mu\text{g/ml}$
1/20	$1,09 \mu\text{g/ml}$
1/30	$0,92 \mu\text{g/ml}$
1/40	$0,80 \mu\text{g/ml}$
1/50	$0,70 \mu\text{g/ml}$
1/60	$0,62 \mu\text{g/ml}$

On peut obtenir une courbe standard en fonction de logarithme de la concentration de protéine d'albumine et la densité optique à l'aide de spectrophotomètre.

Pour le microessai du Bio-Rad, on dilue habituellement les surnageant B.t. dissous 20 ou 40 fois, puis on mesure la densité optique de solutions de protéines du surnageant de solubilisation des toxines à l'aide de spectrophotomètre après réaction avec le réactif de Bio-Rad. Sur la courbe de standard on peut trouver la quantité de protéines dans un surnageant de solubilisation des toxines du B.t. avec la densité optique correspondante.

## ANNEXE 6:

### Le calcul de DTCT50 des diverses souches de B.t. et du Blank

#### Méthode de Kärber:

Cette méthode utilise la formule suivante pour apprécier la dose infectieuse 50%:

$$DTCT_{50} = -\Delta - \acute{O} (S - 0,5)$$

où  $\Delta = \log^{10}$  de la dilution montrant 100%  
de dégénérescence

$\acute{O} = \log^{10}$  du facteur de dilution

$$\log 10^{10} = 1,0$$

$$\log 10^5 = 0,7$$

$$\log 10^2 = 0,3$$

S = somme des fractions de cupules dégénérées

par dilution, incluant celles de la dilution où  
il y a 100% de dégénérescence. Cette dernière  
a pour valeur l'unité, et chaque autre dilution  
une fraction de l'unité.



Exemple:

(+ culture dégénérée, - culture normale)

-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
1/1024	1/256		1/64		1/16		1/4		Témoins		
	1/512		1/128		1/32		1/8		1/2		

$$DTCT50 = -\Delta - \delta (s - 0,5)$$

$$\Delta = \log_{10}^{16}, \delta = \log_{10}^2, S = 1 + 2/8 = 1,25$$

$$DTCT50 = -\log_{10}^{16} - \log_{10}^2 (1,25 - 0,5)$$

$$DTCT50 = -1,2 - 0,3 \times 0,75 = -1,425$$

$$DTCT50 = 10^{-1,425}/0,05ml = 10^{-1,425 - 1,3} /ml = 10^{-2,725}/ml$$

Si la concentration de protéine du M-ONE = 5,2 mg/ml

$$\text{La dose toxique 50\%} = 5,2 \text{ mg/ml} / 10^{2,725} \times 20 = 0,49\mu g$$

## ANNEXE 7:

### La préparation de la solution de P.B.S.utilisée

(Phosphate buffered saline à pH 7,4)

#### Solution A:

$\text{NaCl}$	8,00 g
$\text{KCl}$	0,20 g
$\text{NaHPO}_4$	1,15 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,20 g
Eau distillée	800,00 ml

#### Solution B:

$\text{NaCl}_2$	0,10 g
ou $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,132 g
Eau distillée	100,00 ml

#### Solution C:

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
Eau distillée	100,00 ml

On dissout les sels dans l'ordre indiqué. On conserve le tampon à 4°C jusqu'à utilisation.

Note: Ajouter la solution B en dernier et par petite quantité en agitant constamment à l'aide d'une bille magnétique. Ceci a pour but d'éviter la précipitation du  $\text{CaCl}_2$  avec l'ensemble mais surtout avec les ions phosphates.